INTAKTE UND DEFEKTE PHAGEN VON WASSERSTOFFBAKTERIEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Georg Auling
aus Ahaus (NRW)

Göttingen 1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534926_0016

INTAKTE UND DEFEKTE PHAGEN VON WASSERSTOFFBAKTERIEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Georg Auling
aus Ahaus (NRW)

Göttingen 1975

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. F. Mayer

Tag der mündlichen Prüfung: 13.2.1975

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H. G. Schlegel für die Aufnahme am Institut für Mikrobiologie, für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine stets gewährte Unterstützung danken.

Für die Ermutigung zur Durchführung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. H. Prell und Herrn Doz. Dr. W. Lotz.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Mayer, durch dessen freundliche Kooperation und vorbildliche Einweisung mir die Einarbeitung in Methoden der Elektronenmikroskopie erleichtert wurde.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. E. G. Bade, Dr. R. Brinkmann, I. Probst, Dr. M. Reh, Dr. K. Schmidt und Dr. W. Schumann, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit behilflich waren.

Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
EM	Elektronenmikroskop
EOP	efficiency of plating
MOI	multiplicity of infection
OD	Optische Dichte
PEG	Polyäthylenglykol-6000
PHB	Poly-ß-hydroxybuttersäure
Tg	Trockengewicht

Inhaltsverzeichnis

		Seite
EINLEITUNG		1
MATERIAL UND METHODEN		3
1.	Organismen	3
2.	Nährlösungen und Kulturverfahren	6
2.1.	Standard-Mineralmedium für Wasserstoffbakterien	6
2.2.	Autotrophe Anzucht	6
2.3.	Heterotrophe Anzucht	8
2.4.	Feste Nährböden, Herstellung und Inkubation	8
2.5.	Aufbewahrung der Stammkulturen	9
3.	Bestimmung der Zelldichte	11
3.1.	Trübungsmessung	11
3.2.	Lebendzellzahlbestimmung	11
3.3.	Trockengewichtsbestimmung	11
4.	Colometrische Methoden	12
4.1.	Proteinbestimmung ganzer Zellen	12
4.2.	Bestimmung des Ammoniumgehaltes im Kulturmedium	12
4.3.	Poly-ß-hydroxybuttersäure-Bestimmung	13
5.	Methoden zur Charakterisierung der neuen Wasserstoffbakterien	14
5.1.	Gramfärbung	14
5.2.	Prüfung der Begeißelung und weiterer morphologischer Charakteristika	14
5.3.	Prüfung der Substratverwertung	14
5.4.	Cytochrombestimmung	15
5.5.	Carotinoidextraktion und -bestimmung	16

Seite

6. Phagensuche bei den Laborstämmen 18
6.1. Klassische Methoden 18
6.2. Induktionsverfahren 19

7. Methode der Simultanisolierung neuer Phagen und Wirtsbakterien 21

8. Handhabung der neuisolierten Phagen 22
8.1. Durchführung der Plaquetests 22
8.2. Reinigung der neuen Phagen 23

9. Methoden zur Charakterisierung temperenter Phagen 24

10. Bestimmung der spezifischen Dichte 25

11. Elektronenmikroskopische Techniken 26

12. Chemikalien 28

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE 29

A. Versuche mit Laborstämmen 29

1. Suche nach Bakteriophagen mit klassischen Methoden 29
1.1. Versuche zur Phagenisolierung aus Bodenproben 30
1.2. Versuche zur Erweiterung des Wirtsbereichs bekannter Phagen 30
1.3. Kreuztest zur Isolierung lysogener Stämme 31
1.4. Isolierung von sensiblen Indikatorbakterien aus möglicherweise lysogenen Kulturen 31

Seite

2. Der Nachweis defekt lysogener Stämme in Alcaligenes eutrophus durch Induktionsversuche 32
2.1. Induktion der Laborstämme als "Screening" auf temperente Phagen 32
2.2. Überprüfung der Induktion mit elektronenoptischen Methoden 35

B. Simultanisolierung von intakten Phagen und Knallgasbakterien - mit anschließender Charakterisierung der neuen Bakteriophagen und ihrer Wirtsbakterien 41

1. Experimente zur gleichzeitigen Isolierung aus demselben Standortsmaterial 41

2. Charakterisierung der neuen Bakteriophagen 45
2.1. Identifizierung und Diskriminierung der Phagen durch Plaquemorphologie und Wachstum 46
2.2. Einfluß der hetero- und autotrophen Inkubationsbedingungen auf Plaquemorphologie und Wachstum 50
2.3. Stabilität der Phagen und Gewinnung von Lysaten 53
2.4. "Efficiency of plating" und Adsorption der Phagen 56
2.5. Lysogenisierungsfähigkeit der neuen Phagen 58
2.5.1. Nachweis der lytischen Aktivität lysogener Clone und ihrer Immunität gegen überinfizierende homologe Phagen 58
2.5.2. Induzierbarkeit lysogener Stämme 60
2.5.3. Spontane "clear-Plaque"-Mutanten als zusätzlicher Hinweis auf die temperente Natur der Phagen 62
2.6. Bestimmung der spezifischen Dichte ρ der Phagen 62
2.7. Nachweis enger Verwandtschaft der vier Phagen aus der Anreicherung 43 durch Experimente zur kreuzweisen Immunität 64

Seite

2.8. Versuch einer Transduktion der Rifampicinresistenz durch den Phagen gd2 64
2.9. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktur der Phagen 65
2.9.1. Beobachtungen an den Phagen der Gruppe I 66
2.9.2. Beobachtungen an den Phagen der Gruppe II 71

3. Charakterisierung der neuen Wirtsbakterien 78
3.1. Untersuchungen zum Wachstum der Wirtsbakterien unter autotrophen Bedingungen 78
3.2. Verwertung von Substraten 83
3.3. Morphologie der neuen Wasserstoffbakterien 86
3.4. Bestimmung von Cytochromen 87
3.5. Bestimmung und Isolierung von Pigmenten 91

DISKUSSION 94

I. Intakte Bakteriophagen für Alcaligenes eutrophus 94

II. Intakte Bakteriophagen für sonstige Wasserstoffbakterien 96

III. Das Phänomen der defekten Lysogenie 101

IV. Probleme bei der taxonomischen Einordnung der Wirtsbakterien 107

ZUSAMMENFASSUNG 112

ANHANG 114

LITERATUR 119

EINLEITUNG

Die Wasserstoff-oxidierenden Knallgasbakterien gelten schon seit geraumer Zeit als bemerkenswerte Gruppe unter den Bakterien, weil sie ohne jedes organische Substrat in einer einfachen Nährlösung von Mineralsalzen unter einer Atmosphäre von gasförmigem Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlendioxyd wachsen können (Schlegel, 1966; Schlegel und Lafferty, 1971). Die seit über einem Jahrzehnt an einem bestimmten H_2-Bakterium, Hydrogenomonas eutropha Stamm H16, jetzt Alcaligenes eutrophus (Davis et al., 1969) genannt, durchgeführten intensiven Untersuchungen verlocken zu dem Versuch, für diesen Organismus ein genetisches System aufzubauen. Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit war für die Knallgasbakterien keines der drei möglichen Systeme des Gentransfers (Transformation, Konjugation und Transduktion) publiziert. Jedoch lagen Berichte über Isolierungen von Phagen für Wasserstoffbakterien vor (Pootjes, 1964; Pootjes et al., 1966; Khavina et al., 1968). Es lag also nahe, Bakteriophagen für die zahlreichen im hiesigen Institut untersuchten Wasserstoffbakterien zu isolieren und zu charakterisieren. Später sollen sich daran Bemühungen anschließen, einen wahrscheinlich existierenden Transduktionsmechanismus für solche neugewonnenen Phagen nachzuweisen und aufzuklären. Für das über das Thema dieser Arbeit hinausgehende Fernziel einer genetischen Analyse der Knallgasreaktion der Wasserstoffbakterien erschien die Neuisolation von Phagen als erster Schritt sinnvoll und eines besonderen Arbeitsaufwandes wert.

Ziel dieser Arbeit war ursprünglich, Phagen für schon im Labor kultivierte Stämme von Knallgasbakterien zu beschreiben. Der experimentelle Befund erbrachte jedoch nur das Vorhandensein von Phagenschwanzpartikeln in den Kulturen der Laborstämme. Somit ergab sich die Notwendigkeit der Neuisolation von Phagen bzw. von H_2-oxidierenden Wirtsbakterien und deren Charakterisierung.

Dementsprechend ist die vorliegende Arbeit in drei Abschnitte gegliedert: Einleitend werden Versuche beschrieben, nach klassischen Methoden Phagen für die Laborstämme zu finden. Außerdem wird die in Induktionsexperimenten ermittelte Art der Lysogenie bei Alcaligenes eutrophus ausführlicher charakterisiert. Insgesamt haben die hier beschriebenen Versuche mit den bisher im hiesigen Labor kultivierten Wasserstoffbakterien ergeben, daß für diese keine funktionsfähigen Phagen gefunden werden konnten. Es schließt sich die Darstellung von Experimenten an, die mit Phagen und Wirtsbakterien durchgeführt wurden, die gemeinsam von jeweils einem natürlichen Standort isoliert worden waren. Diese Simultanisolierung von Phagen und von Wasserstoffbakterien wird beschrieben. Es folgt eine ausführliche Charakterisierung der neuen Bakteriophagen und ihrer Eigenschaften. Schließlich mußte auch eine vorläufige Charakterisierung der neuisolierten Wirtsbakterien vorgenommen werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen

In den vorliegenden Untersuchungen wurden ausschließlich Wasserstoffbakterien verwandt. Bei der Phagensuche für die Spezies Alcaligenes eutrophus wurden 36 Laborstämme, einschließlich einer PHB-freien Mutante des Stammes H16 benutzt. Diese Stämme wurden aus der Institutssammlung von E. Wilde erhalten. Außerdem kamen die Pseudomonas facilis-Phagen HF, D, R, SH133 und SH6 (Pootjes, 1964; Pootjes et al., 1966) und der entsprechende Indikatorstamm, Pseudomonas facilis ATCC15376 (Schatz und Bovell, 1952), zur Anwendung. Phagen und Bakterien wurden von C.F. Pootjes zur Verfügung gestellt. Bei den Untersuchungen zur Begeißelung der neuisolierten Wirtsbakterien wurden die Stämme 12x (Eberhardt, 1965) und Alcaligenes paradoxus Biotyp I ATCC17713 (Davis et al., 1969)zum Vergleich mitgeprüft.

Ansonsten wurde ausschließlich mit selbstisolierten Wasserstoffbakterien und Bakteriophagen (ga, gb, gc, gd1, gd2, ge und gf) gearbeitet. Von den zahlreichen neuisolierten Wasserstoffbakterien (siehe Anhang dieser Arbeit) wurden nur diejenigen sechs Stämme näher charakterisiert, die als Wirtsbakterien für die neuen Phagen erkannt worden waren (GA, GB, GC, GD, GE und GF).

Tab. 1: Zusammenstellung der benutzten Wasserstoffbakterien

Stammbezeichnung				Autor
Alcaligenes	eutrophus	B19	(DSM515)	Schuster, 1967
"	"	B34		"
"	"	C3A		"
"	"	D1A		"
"	"	D2		"
"	"	D6A		"
"	"	E3		"
"	"	G1A		"
"	"	G3A		"
"	"	G6		"
"	"	G8		"
"	"	G9		"
"	"	G15		"
"	"	G16A		"
"	"	G27	(DSM516)	"
"	"	G29	(DSM517)	"
"	"	G30		"
"	"	H1	(DSM529; ATCC17698)	Bartha, 1961
"	"	H2		"
"	"	H6		Schuster, 1967
"	"	H16	(DSM428; ATCC17699)	Wilde, 1961
"	"	H20	(DSM536; ATCC17700)	Bovell, 1957
"	"		(DSM531; ATCC17697)	Bovell, 1957
"	"	J5		Schuster, 1967
"	"	J8		"
"	"	J9		"
"	"	J10		"
"	"	J11		"
"	"	J20		"

Stammbezeichnung			Autor
Alcaligenes	eutrophus	J23	Schuster, 1967
"	"	J29	"
"	"	J33	"
"	"	J35	"
"	"	J36A	"
"	"	L8	"
"	"	L10	"
Pseudomonas	facilis	(ATCC15376)	Schatz und Bovell, 1952
Alcaligenes	paradoxus	Biotyp I (ATCC17713)	Davis et al., 1969
		12x	Eberhardt, 1965
		GA	Auling, 1975
		GB	"
		GC	"
		GD	"
		GE	"
		GF	"

2. Nährlösungen und Kulturverfahren

2.1. Standard-Mineralmedium für Wasserstoffbakterien

Als Grundmedium für die Anzucht von Knallgasbakterien diente das Mineralmedium nach Schlegel et al. (1961).

(1)	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.9 %
	KH_2PO_4	0.15 %
(2)	NH_4Cl	0.1 %
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02 %
(3)	$FeNH_4$-Citrat	0.0005 %
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.001 %

Die Salzlösungen wurden in entionisiertem Wasser bzw. bidest. Wasser angesetzt, wobei sich die Prozentsätze auf die fertige Nährlösung beziehen. Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert (20 min bei 121° C) und nach dem Abkühlen mit den Zusätzen für autotrophes bzw. heterotrophes Wachstum vereinigt. Der pH-Wert des gesamten Mediums lag bei 7,0 - 7,2.

2.2. Autotrophe Anzucht

Für chemolithotrophes Wachstum wurde dem Medium 0.05% $NaHCO_3$ zugesetzt; die Kulturen wurden unter Standardbedingungen der Gasversorgung mit 10 % O_2, 10 % CO_2 und 80 % H_2 begast.

Um eine zu frühe Wachstumshemmung durch N-Mangel bei der autotrophen Massenanzucht zu vermeiden, wurde im Mineralmedium für die Fermenterkulturen die 0.1 %ige NH_4Cl-Lösung durch die 0.2%-ige $(NH_4)_2SO_4$-Lösung ersetzt. Damit können die Stämme von *Alcaligenes eutrophus* optische Dichten (436 nm gemessen) von 12 ohne N-Mangel erreichen (Brinkmann, pers. Mitteilung). Außerdem wurde 1.0 ml der Spurenelementlösung SL6 (entspricht SL4 nach Pfennig und Lippert (1966), jedoch ohne $FeSO_4$ und EDTA) pro Liter Mineralmedium zugegeben. Zur Sterilisierung größerer Nährlösungsvolumina wurden Sterilfilter (Fa. Seitz, Bad

Kreuznach) verwandt. Dabei wurden wegen des Zurückbleibens der Fe-Kationen im Filter die Spurenelement- und die $FeNH_4$-Citrat-Lösung in autoklavierter Form dem Gesamtvolumen hinzugefügt.

Kleinere Kulturmengen (bis 100 ml) wurden in Erlenmeyer-Kölbchen im Witt'schen Topf auf der Rüttelmaschine, Stellung II bei 30° C inkubiert. Kulturmengen bis zu 400 ml wurden in 1 l- Erlenmeyer-Kolben, solche von 500 ml bis 1000 ml wurden in 2 l - Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen und Begasungsaufsätzen angesetzt. Diese wurden aus Niveauflaschen über sterile Glaswollefilter begast und auf der Schüttelmaschine (Typ RC 106, Infors-AG, Basel) bei 150 Schwingungen/min angezogen.

Zur Massenanzucht wurden 10 l- Biostat-Fermenter (Fa. Braun, Melsungen) mit Temperatursteuerung (30° C) und einem Blattrührer mit 600 Umdrehungen pro Minute benutzt. Die Gasversorgung erfolgte bei einem konstant gehaltenen Vordruck von 2000 mm Wassersäule durch Gasmischpumpen (Typ M 300/a - F, Wösthoff oHG), wobei unter Standardbedingungen die Gesamtgasmenge 500 ml pro Minute betrug. Der Anteil der Gase O_2, CO_2 und H_2 betrug 10 %, 10 % und 80 %, sofern nicht anders angegeben. Die Zellen aus den Fermentern wurden in der Cepa-Durchlaufzentrifuge (Fa. Padberg, Lahr/Baden) geerntet und in einer Virtis, 10 - 145 MR - BA, Freeze-Mobile - Gefriertrocknungsanlage (Fa. Gardinger, New York/USA) gefriergetrocknet. Die lyophilisierten Zellen wurden für die Carotinoid- und einen Teil der Cytochrombestimmungen in Plastikflaschen verschlossen aufbewahrt.

2.3. Heterotrophe Anzucht

Für organotrophes Wachstum wurde das Mineralmedium mit dem betreffenden organischen Substrat bis zu einer Konzentration von 0,5 % (bei organischen Säuren höchstens 0,2 %) versetzt. Als Vollmedium diente Difco-Nutrient Broth (8,0 g/l). Diesem NB-Medium wurde in der Regel 0,5 % Fruktose zugesetzt, weil viele Wasserstoffbakterien in nicht mit Zuckern supplementiertem NB-Medium mit einer sehr langen lag-Phase wachsen.

Alle heterotrophen Anzuchten kleiner Zellkulturen (1 - 10 ml) wurden mit Hilfe von Rollbebrütern (Fa. Nägele, Frankfurt/ Main) durchgeführt. Diese besaßen eine langsam drehende Scheibe, in die 1 bis 36 Reagenzgläser (16 cm x 1,5 cm oder 17,5 cm x 1,9 cm) mit lose aufgesetzten Aluminiumkappen in einem Winkel von 45° eingesetzt wurden. Dieses Inkubationsverfahren garantiert bei Kulturmengen bis zu 5 ml in den normalen Reagenzgläsern und bis zu 10 ml in den dickeren Reagenzgläsern (Ø 19 mm) genügend aerobe Wachstumsverhältnisse und ist besonders geeignet für die gleichzeitige Anzucht vieler verschiedener Bakterienstämme. Es bietet außerdem genügend Sicherheit gegen Kontamination selbst bei Inkubationen von 14 Tagen bis 3 Wochen.

2.4. Feste Nährböden, Herstellung und Inkubation

Feste Nährböden in Plastik-Petrischalen enthielten 1,5 % Agar. Zur Herstellung von Mineralagarplatten für autotrophes Wachstum wurden zunächst die gewünschten Mengen Agar und bidest. Wasser mindestens 20 Minuten bei 121° C zusammen autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 90 bis 70° C wurden aus den vorher autoklavierten, 10-fach konzentrierten Lösungen 1 und 2 und der 100-fach konzentrierten Lösung 3 des Standardmineralmediums die entsprechenden Mengen zupipettiert und ohne allzu

große Schaumbildung vermischt. Danach wurden die Platten gegossen.

Für die Experimente mit den neuisolierten Bakteriophagen wurden Platten mit einer Mindestmenge von 25 ml pro Petrischale und einem Agargehalt von nur 1,2 % zur erleichterten Diffusion der Phagen gegossen. Wichtig war ferner, daß die Platten blasenfrei und ohne Schräglage der Oberfläche gegossen waren, weil sie sonst nicht für die Weichagartechnik benutzt werden konnten. Außerdem konnten die Platten für Phagenexperimente frühestens 1 bis 2 Tage nach dem Gießen benutzt werden. Ohne ein leichtes Antrocknen des Agars (bei Zimmertemperatur) war eine auswertbare Ausbildung der Einzelplaques bei der Titration der Phagen durch den zu hohen Feuchtigkeitsgehalt der Platten nicht gewährleistet. Nach dem Antrocknen wurden die Platten in Plastiktüten luftdicht verschlossen im Kühlraum aufbewahrt. Dadurch wurde schnelles Eintrocknen verhindert, und die Platten konnten daher noch nach zweimonatiger Aufbewahrung zur Titration von Phagen benutzt werden.

2.5. Stammkulturen

Für Dauerkulturen wurden Schrägröhrchen mit 1,2 % Agar angelegt. Es wurde zum Teil der Einfachheit halber NB-Medium verwandt. Die Haltbarkeit der meisten Wasserstoffbakterien läßt sich jedoch auf NB-Medium höchstens für 5 bis 6 Wochen garantieren, abgesehen davon, daß bei fortgesetzter heterotropher Lebensweise die Fähigkeit zur Chemolithotrophie verlorengehen kann (Kluyver und Manten, 1942). Autotrophe Dauerkulturen vieler Wasserstoffbakterien können dagegen nachweislich noch nach 6 Monaten Aufbewahrung bei 4° C im Kühlschrank vermehrungsfähig überimpft werden. Zur Herstellung autotropher Schrägröhrchen wurde das Mineralmedium nach Kaserer (1906) mit seiner geringen Salzkonzentration verwandt, das problemlos zusammen mit Agar autoklaviert werden kann.

Mineralmedium nach Kaserer

KH_2PO_4	0.05 %
NH_4Cl	0.1 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02 %
$NaHCO_3$	0.05 %
$Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$	0.005 %

Der pH-Wert der fertigen Nährlösung beträgt 6,8 bis 7,2. Die beimpften Schrägröhrchen wurden entweder 2 Tage heterotroph oder 3 bis 6 Tage autotroph im Witt'schen Topf mit der Standardgasmischung inkubiert.

3. Bestimmung der Zelldichte

3.1. Trübungsmessung

Die optische Dichte der Laborstämme und der neuisolierten Wasserstoffbakterien wurde im Spectronic-70 (Bausch und Lomb) bei 623 nm entweder direkt im Reagenzglas oder in 1 cm-Plastikküvetten gegen unbeimpfte Nährlösung gemessen. Bei den Fermenteranzuchten erfolgte die Trübungsmessung in 1 cm-Plastikküvetten im Eppendorf-Photometer bei 546 nm gegen H_2O als Leerwert. Suspensionen, die eine Extinktion von 0.3 bis 0.4 überschritten, wurden für die Messungen in den Küvetten verdünnt.

3.2. Lebendzellzahlbestimmung

Für Keimzahlbestimmungen wurden die Kulturen in 10^{-1}- bzw. in 10^{-2}-Verdünnungsstufen bis auf 5×10^3 Zellen/ml verdünnt. Daraus wurden 0.1 ml mit einer an der Spitze runden 0.1 ml-Auslaufpipette gleichmäßig auf NB-Platten ausgestrichen. Die gewachsenen Einzelkolonien mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert ergaben die Lebendzellzahl der betreffenden Kultur.

3.3. Trockengewichtsbestimmung

Es wurden je nach Dichte der Kulturen 20 ml-, 10 ml- und 5 ml-Probemengen entnommen und auf gewichtskonstante Membranfilter SM 11307, Ø 50 mm, Porengröße 0.2 µm (Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen) übertragen. Die abgesaugten Zellen wurden mit 10 ml bidest. Wasser nachgewaschen und bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

4. Colorimetrische Methoden

4.1. Proteinbestimmungen an ganzen Zellen

Die Proteinbestimmung wurde nach der von La Riviere (1958) angegebenen und von Schmidt et al. (1963) modifizierten Methode durchgeführt.

Reagenzien:

Lösung A	16 g	NaOH	in 100 ml
Lösung B	5 g	K-Na-Tartrat	
	1 g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	
	2.5 g	KJ	
	4 g	NaOH	in 400 ml

Von den Bakteriensuspensionen wurden 4 ml in Zentrifugengläsern pipettiert, die Zellen zweimal gewaschen und wieder auf 4 ml mit H_2O gebracht, mit 0.4 ml Lösung A versetzt und mit einer Glaskugel verschlossen 10 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach schnellem Abkühlen wurden 1.6 ml Lösung B zugegeben und gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad wurden die Zellreste durch Zentrifugation entfernt und die optische Dichte bei 546 nm in 1 cm- bzw. 2 cm-Küvetten gemessen gegen den Reagenzienleerwert. Standard: Rinderserumalbumin; die Eichkurve verlief bis 4 mg Protein pro Testansatz linear.

4.2. Bestimmung des Ammoniumgehalts im Kulturmedium

Ammonium wurde im Zentrifugenüberstand der Fermenterkulturen mit Hilfe des Harnstoff-Farbtestes Best.-Nr. 15954 aus der Biochemica-Test-Combination der Fa. Boehringer bestimmt.

Reagenzien:

Lösung (1)	Phenol	0.106	M
	Nitroprussid-Na	0.17	mM

Lösung (2) NaOH 0.125 M
Na-Hypochlorit 11.0 mM

Von den Fermenterkulturen wurden Proben entnommen und nach dem Abzentrifugieren der Zellen auf 1/100 verdünnt. Daraus wurden 2 ml mit je 2 ml der Lösungen 1 und 2 bei 37° C 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Die Extinktion wurde in 1 cm-Küvetten bei 546 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Als Standard wurde $(NH_4)_2SO_4$ verwandt. Die Eichkurve war im Bereich von 0 bis 10 µg NH_4^+ pro ml linear.

4.3. Poly-ß-hydroxybuttersäure-Bestimmung

Zur Ermittlung des PHB-Gehalts der Zellen wurde die von Jüttner (1973) entwickelte Methode des direkten IR-photometrischen Nachweises im Chloroformextrakt übernommen. Definierte Mengen gefriergetrockneten Zellmaterials wurden in einem aliquoten Teil $CHCl_3$ 12 bis 18 Stunden auf einem Rotationsschüttler extrahiert. Danach wurden die Zellreste auf einem Faltenfilter abgetrennt. Das Filtrat wurde im Pye-Unicam SP1000-Infrarot-Spektralphotometer gemessen. Die Carbonyl-Bande von PHB absorbiert selektiv bei einer Wellenlänge von 5.74 µm, das entspricht einer Wellenzahl von 1745. Für die PHB-$CHCl_3$-Lösung gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz (Jüttner, 1973).

5. Methoden zur Charakterisierung der neuen Stämme

5.1. Gramfärbung

Die Gramfärbung wurde entsprechend Hucker's Modifikation, übernommen aus Cowan und Steel (1965), durchgeführt.

5.2. Prüfung der Begeißelung und weiterer morphologischer Charakteristika

Zur Untersuchung der Morphologie der neuen Stämme, insbesondere der Begeißelung, wurden in erster Linie autotrophe Schüttel- und Fermenterkulturen sämtlicher Wachstumsphasen benutzt. Eine parallele Prüfung von NB-Kulturen wurde ebenfalls durchgeführt. Das dabei angewandte elektronenmikroskopische Verfahren ("negative-staining") wird gesondert beschrieben (siehe Kapitel 11 (Seite 26).

5.3. Prüfung der Substratverwertung

Substratteste wurden ausschließlich auf Agarplatten, aber nicht in Flüssigkeitskulturen durchgeführt. Die Mineralmediumplatten enthielten 0.5 % Zucker oder 0.2 % Säuren oder andere organische Verbindungen, die nach getrenntem Autoklavieren dem flüssigen Agar bei 80° C zugesetzt worden waren. Nur PHB wurde dem Agar in fester flockiger Form zugegeben. Für die Tests wurde entsprechend der Lederberg-Technik mit Samttüchern überstempelt: von Gluconat-Mutterplatten auf jeweils 6 Substratplatten, auf eine Kontrollplatte ohne Substrat und zum Abschluß auf eine NB-Platte. Das Wachstum wurde nach 3 bis 6 Tagen geprüft.

5.4. Cytochrombestimmung

Zellkulturen (heterotroph 20 ml, autotroph 200 ml) wurden gegen Ende des logarithmischen Wachstums geerntet und 20 min mit 5000 g zentrifugiert, das Sediment anschließend in 2 ml 50 mM KP-Puffer, pH 6,8, resuspendiert und bei -20° C eingefroren. So vorbereitete Zellen wurden 1 min/ml mit Ultraschall (Braun-Sonic-300, Durchmesser der Sonde 0,5 cm, Einstellung 50) behandelt, anschließend mit 50 mM KP-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und dann mit 120 000 g 1 Stunde bei 5° C zentrifugiert (Omikronzentrifuge, Rotor 20 x 10, Fa. Heraeus-Christ, Osterode). Das Überstehende der hochtourigen Zentrifugation wurde als lösliche Fraktion angesehen. Der rötliche Belag auf dem Pellet wurde mit einem kleinen Spatel vorsichtig abgekratzt und mit Hilfe eines Glas-Homogenisators in etwa 3 bis 5 ml KP-Puffer resuspendiert. Diese Suspension enthielt die Cytochrome und andere membrangebundene Komponenten der Atmungskette; sie wurde als Membranfraktion bezeichnet. Zur Aufnahme der Differenzspektren wurden Na-Dithionit-reduzierte Suspensionen gegen Luft-oxidierte Suspensionen bei Zimmertemperatur im Zeiss-DMR 21-Doppelstrahlphotometer in 1 cm-Glasküvetten im Spektralbereich von 700 bis 500 nm durchgemessen.

Die Bestimmung der Cytochrome erfolgte aufgrund der Absorptionsmaxima ihrer α-Banden in den Differenzspektren (Kamen und Horio, 1970). Maxima bei 550 bis 554 nm wurden dem Cytochrom c, bei ca. 560 nm dem Cytochrom b und solche bei ca. 600 nm einem Cytochrom vom a-Typ zugesprochen. Ein Absorptionsmaximum zwischen 620 und 630 nm wurde als charakteristisch für Cytochrom a_2 angesehen. Zur genaueren Identifizierung auch geringerer Anteile des Cytochroms a_2 wurden gefriergetrocknete Zellen mit 50 %igem Pyridin in 0.1 N NaOH 15 min extrahiert. Diese Pyridinextrakte wurden nach dem Abzentrifugieren der Zellreste ebenfalls zur Herstellung von Differenzspektren verwandt.

5.5. Carotinoidextraktion und -bestimmung

Von autotroph gewachsenen Kulturen wurde 1 g gefriergetrocknetes Zellmaterial mit einem Aceton : Methanol-Gemisch (1 : 1 v/v) unter N_2 solange extrahiert, bis sich keine Pigmente mehr lösten. Anschließend wurde im Unicam Sp 1800 (Fa. Pye Unicam Ltd., Cambridge) mit 1 cm-Quarzküvetten bei Zimmertemperatur das Spektrum von 350 nm bis 500 nm gemessen.

Vom Stamm GB wurden ca. 30 g gefriergetrocknetes Zellmaterial in der beschriebenen Weise extrahiert und anschließend verseift. Dazu wurde der Extrakt unter Vakuum bis zur Trockne eingeengt und mit einem kleinen Volumen Methanol wieder gelöst. Zur Verseifung wurde diese Lösung mit der gleichen Menge methanolischer KOH (Endkonzentration 5% KOH) versetzt und unter gelegentlichem vorsichtigen Schütteln 1 bis 1 1/2 Stunden unter N_2 bei Zimmertemperatur stehengelassen (Liaaen-Jensen, 1962). Die Carotinoide wurden dann mit 6%iger NaCl-Lösung in Äther übergetrieben, Methanol und KOH wurden aus der Ätherphase mit NaCl-Lösung ausgewaschen und die Pigmente nochmals im Vakuum getrocknet. Für eine erneute Aufnahme von Spektren wurden geringe Mengen der getrockneten Pigmente sowohl in Aceton wie in Äther wieder gelöst.

Für die chromatographische Trennung einzelner Komponenten des Pigmentgemisches wurde die Hauptmenge der getrockneten Pigmente in Aceton bzw. in Petroleumbenzin wieder aufgenommen. Die Isolierung einzelner Carotinoide wurde auf zwei Wegen versucht:

a) an einer Al_2O_3-Säule der Aktivitätsstufe III (Brockmann und Schodder, 1941) mit steigenden Mengen Äther und Aceton in Petroleumbenzin (Sp.: 40 - 60° C),
b) auf Dünnschichtplatten mit Kieselgel G (Merck) in einer Schichthöhe von 0,5 mm mit 30% Aceton in Petroleumbenzin als Laufmittel.

Die Rf-Wert-Bestimmungen der Komponenten I und II wurden mit Schleicher und Schüll-Rundfiltern papierchromatographisch nach Jensen und Liaaen-Jensen (1959) mit steigenden Mengen Aceton in Petroleumbenzin durchgeführt. Das Verteilungsverhältnis der Komponenten I und II wurde zwischen Methanol (5 %, 15 % oder 25 % H_2O-Anteil) und Petroleumbenzin bestimmt (Petracek und Zechmeister, 1956). Für die quantitative Auswertung wurde als Extinktionskoeffizient ein Wert von 2500 angenommen.

6. Phagensuche bei den Laborstämmen

Bei allen Arbeiten mit Phagen bzw. zur Isolierung von Phagen wurde auf Methoden zurückgegriffen, die Adams in einem methodischen Anhang (Methods of Study of Bacterial Viruses, S. 443-522) zu seinem 1959 erschienenen Buch "Bacteriophages" ausführlich dargestellt hat.

6.1. Klassische Methoden

Zur Phagenisolierung aus Bodenproben wurde nach folgendem doppelten Anreicherungsverfahren vorgegangen: In NB-Medium gewachsene Über-Nacht-Kulturen der Laborstämme B19 bis H16 (siehe Tabelle 1) wurden abzentrifugiert und in 10 ml-Mineralmedium-Extrakten von Bodenproben, denen bei der Extraktion zum Schutz möglicher Phagen schon 0.1 % Gelatine zugesetzt worden war, resuspendiert. Diese Suspensionen wurden nach 4 Tagen autotropher Inkubation unter der Standardgasmischung im Witt'schen Topf abzentrifugiert: 2 ml des Überstehenden wurden zu 5 ml frisch angezogenen NB-Kulturen der Stämme B19 bis H16 in großen Reagenzgläsern (Ø 1,9 cm) zupipettiert und bei 30° C über Nacht auf dem Rollbebrüter inkubiert. Danach wurden die Kulturen bei 7000 U/min abzentrifugiert, das Überstehende durch Zugabe von Chloroform bakterienfrei gemacht und als Lysat im Tropftest auf NB-Platten gegen die Laborstämme von Alcaligenes eutrophus getestet.

Bei dem Tropftest mit den Pseudomonas facilis Phagen wurden 0.5 %ige Fruktose-Mineralplatten verwandt. Als Weichagar wurde NB-Medium benutzt, das mit 0.5 % Fruktose, 1 mM Ca^{2+} und 1 mM Na^{+} supplementiert war.

Zur Durchführung des Kreuztestes zur Isolierung lysogener Stämme wurde der Tropftest mit Platten durchgeführt, die NB-Medium im Unterschicht-Agar enthielten.

Bei der Isolierung von sensiblen Indikatorbakterien wurden 24 Stunden bei 30° C bebrütete NB-Kulturen um den Faktor 10^{-5} verdünnt und nach erneuter Bebrütung von 6 Stunden mit einem Verdünnungsfaktor von 10^{-2} bis 10^{-3} ausplattiert. Durch dieses Verfahren war das Auswachsen von ca. 500 Einzelkolonien gewährleistet. Sie wurden nach 20 Stunden Inkubation mit Lysaten besprüht.

6.2. Induktionsverfahren

Die Hemmwirkung von Mitomycin-C wurde mit 1 ml-NB-Kulturen der Laborstämme B19, G27, G1A, H6, H20 und J10 durch Zugabe einer Endkonzentration von 1.25 bis 10 ug/ml geprüft. Die Kulturen wurden mit Papierstreifen aus Flüssigkeitskulturen sehr dünn angeimpft und stehend ohne Schütteln bei 30° C bebrütet. Der Anteil teilungsfähiger Zellen nach der Mitomycin-C-Behandlung wurde durch Ausplattieren der verdünnten Kulturen bestimmt.

Die Mitomycin-C-Induktion wurde in NB-Medium durchgeführt, das mit 0.5%iger Fruktose supplementiert war. Über-Nacht-Kulturen der Alcaligenes-Stämme wurden 1 : 100 verdünnt und ca. 4 Stunden wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen bei einer Trübung von 0.2 bis 0.5 für 1 Stunde mit 2 bis 5 µg Mitomycin pro ml in Kontakt gebracht, danach gewaschen, in frischem Medium gleicher Zusammensetzung resuspendiert und mindestens 7 Stunden im Dunkeln bei 30° C nachinkubiert.

Bei Serienversuchen wurde in der Regel nach dem Resuspendieren der Zellen 1 ml aus jeder Kultur für eine gemeinsame Nachinkubation entnommen. Diese vereinigten Kulturen wurden am Ende der Nachinkubation zur Konzentrierung möglicher vorhandener Phagen einer Polyäthylenglykol- 6000-Fällung (PEG-Fällung) unterworfen (Yamamoto et al., 1970). Dazu wurde nach

Abzentrifugation der Zellen das Überstehende mit 3% PEG-6000 und 0.5 M NaCl (beides Endkonzentration) versetzt und bei 5° C mindestens 4 Stunden stehen gelassen. Durch eine Zentrifugation von 20 min bei 10 000 g sollten die Phagen sedimentiert werden. Das Überstehende wurde bis zu einer Endkonzentration von 12% weiteren PEG-Fällungen unterworfen. Alle Sedimente wurden in 1 ml NB-Medium für die Elektronenmikroskopie resuspendiert.

Zur Auffindung der für die UV-Induktion geeigneten Dosis (diejenige Dosis an UV-Strahlung, die 99% Letalität bei den bestrahlten Zellen bewirkt: Krizsanovich, pers. Mitteilung) wurden von den Laborstämmen H16 und J10 NB-Kulturen verschiedener Dichte gewaschen und in 0.5%ige Fruktose-Minerallösung resuspendiert, in sterilen Glasplatten mit magnetischer Rührung gemischt und im Abstand von 40 cm bei Einwirkungszeiten von 5 bis 60 sec mit einer Original-Hanau-Lampe (Quarzlampen GmbH, Hanau, Nr. 389311) bestrahlt. Der Anteil überlebender Zellen wurde durch Direktausplattierung bestimmt. Nur für den in Abbildung 1 dargestellten Modellversuch (Seite 34) mit dem Stamm H16 wurde die UV-Bestrahlung direkt in der NB-Kultur durchgeführt. Bei den Induktionsversuchen zur Isolierung von temperenten Phagen wurden ausschließlich auf NB-Platten gewachsene frische Weichagarbakterienrasen 15, 30, 45 und 60 sec mit UV-Licht bestrahlt und im Dunkeln 24 Stunden bei 30° C nachinkubiert. Anschließend wurden 3 bis 5 ml NB-Medium zur Extraktion der Phagen auf den Bakterienrasen pipettiert. Nach 4 Stunden wurden die vereinigten Extraktionslösungen differenziert zentrifugiert, das Sediment der hochtourigen Zentrifugation resuspendiert und für die spätere elektronenmikroskopische Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

7. Methode der Simultanisolierung neuer Phagen und Wirtsbakterien

Im Ergebnisteil dieser Arbeit ist ausführlich beschrieben, welche Überlegungen bei der Durchführung der Simultanisolierung zu berücksichtigen waren. Im einzelnen wurden 2 bis 5 g Boden zur Anreicherung benutzt, bzw. es wurden 5 bis 10 ml aus schon angewachsenen Mineralmediumflaschen überimpft, die zur Aufnahme von Flüssigkeitsproben einen durchbohrten Gummistopfen mit Schraubverschluß besaßen und mit der Standardgasmischung begast worden waren. Die begasten 50 ml-Flaschen wurden von M. Reh zur Verfügung gestellt. Während der Anreicherung wurden beide Passagen jeweils 8 bis 10 Tage inkubiert. Bei den Anreicherungen 39 bis 48 wurde zusätzlich 1 ml Vitaminlösung/l Mineralmedium zugegeben; mit einem derart supplementierten Mineralmedium war Schuster (1967) die Direktisolierung zahlreicher Stämme von Alcaligenes eutrophus auf Platten gelungen.

Die Isolierung der neuen Wasserstoffbakterien wurde auf Mineralmediumplatten durchgeführt, die für ca. eine Woche autotroph mit der Standardgasmischung im Witt'schen Topf bei 30° C inkubiert wurden. Einzelkolonien wurden entweder durch Ausstreichen mit der Impföse oder durch Ausplattieren von Verdünnungen (10^{-4} bis 10^{-6}) der Kulturproben während oder am Ende der zweiten Passage gewonnen. Die so isolierten Wasserstoffbakterien wurden durch Überimpfen auf NB-Platten auf Reinheit und durch Überimpfen auf autotrophe Mineralmediumplatten auf Fähigkeit zur Wasserstoffoxidation geprüft. Anschließend wurden sie auf Schrägröhrchen mit Kaserer-Mineralmedium gezogen bzw. für den Tropftest mit den neuen Phagenlysaten als Wirtsbakterien geprüft.

8. Handhabung der neuisolierten Phagen

Bei dem Studium der neuen Bakteriophagen wurde ebenfalls auf die von Adams (1959) beschriebenen Methoden zurückgegriffen. Einige methodische Einzelheiten sind allerdings im Ergebnisteil der Arbeit dargestellt, weil sie für die neuen Phagen erst ausgearbeitet werden mußten.

8.1. Durchführung der Plaquetests

Die neuen Phagen wurden nach der Weichagar-Technik ausschließlich auf Mineralmediumplatten geprüft. Diese waren nur für heterotrophe Inkubationen mit einer zusätzlichen organischen C-Quelle versetzt. Als Weichagar wurde in allen Versuchen Kaserers Mineralmedium mit Agarzusatz (7,5 g/l) benutzt. Die Titration der Phagen wurde zunächst mit 3 ml bei 45° C gehaltenem Weichagar, später bei besserer Beherrschung der Methode mit 2 ml Weichagar durchgeführt. Alle Indikatorbakterien wurden als NB-Kulturen angezogen und jeweils 0.1 bis 0.5 ml zusammen mit 0.1 ml der entsprechenden Verdünnung eines Phagenlysats in die Röhrchen mit Weichagarlösung pipettiert, diese wurden gerollt, auf den Unterschicht-Agar ausgegossen und die Platten nach 2 Stunden inkubiert. Bei der autotrophen Inkubation mußte darauf geachtet werden, daß der Witt'sche Topf nicht zu voll mit Platten gepackt wurde oder daß wiederholt belüftet wurde, weil sonst die Ausbildung der Plaques beeinträchtigt bzw. verhindert wurde. Aus dem gleichen Grunde wurden stets nicht zu stark eingetrocknete Platten verwandt.

8.2. Reinigung der neuen Phagen

Die Phagen ließen sich ohne Schaden verdünnen in NB-Medium, in Mineralmedium nach Schlegel oder Kaserer und wurden in der Regel in Phagenpuffer (Clowes und Hayes, 1968) verdünnt, der mit 0.01 % Gelatine zum Schutz der Phagen versetzt war. Sie konnten so gut bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Phagenpuffer:

1)	Na_2HPO_4	7 g
	KH_2PO_4	3 g
	NaCl	5 g
2)	0.1 M $MgSO_4$	10 ml
	0.01 M $CaCl_2$	10 ml
		auf 1000 ml bidest. H_2O

Die Lösungen 1 und 2 wurden nach getrenntem Autoklavieren vereinigt und in 250 ml Portionen aufbewahrt.

Lysate, die in den Tropftests lytische Aktivität gegenüber den neuen Wasserstoffbakterien gezeigt hatten, wurden zur Reinigung der Phagen bis zur Einzelplaque-Bildung verdünnt und ausplattiert. So erhaltene einzelne Plaques wurden steril ausgestochen, in 1 ml Phagenpuffer resuspendiert und anschließend mit Chloroform oder durch Ultrafiltration (Sartorius-Membranfilter, Best. Nr. 11307, Porengröße 0.2 µm) bakterienfrei gemacht. Diese Phagensuspensionen wurden erneut verdünnt und ausplattiert. Über mindestens drei Passagen von Einzelplaques wurde so eine Reinisolierung der neuen Phagen aufgrund der Plaquemorphologie erzielt. Nach Abschluß der Reinigung wurde eine vorläufige elektronenmikroskopische Überprüfung der reinen Lysate vorgenommen, um einen Vergleich mit der elektronenmikroskopischen Analyse der "Erstlysate" aus den jeweiligen Anreicherungen zu haben.

9. Methoden zur Charakterisierung temperenter Phagen

Zur Isolierung lysogener Clone wurden aus dem Inneren der mehr oder weniger trüben Plaques eines jeden Phagen mit sterilen Zahnstochern Zellen abgeimpft und auf NB-Platten in mindestens drei Einzelkoloniepassagen von kontaminierenden Phagen gereinigt. Anschließend wurden diese Zellinien numeriert (z. B.: GA11 bis GA116) und auf NB-Agar in Schrägröhrchen aufbewahrt. Sie sollen als lysogene Clone bezeichnet werden, obwohl der Beweis ihrer lysogenen Natur erst in den nachfolgenden Tests erbracht werden mußte.

Die Prüfung auf Phagenproduktion und Immunität der lysogenen Clone wurde ausschließlich auf autotroph bebrüteten Mineralmediumplatten durchgeführt. Für den ersten Immunitätstest wurden durch Ausstreichen von Flüssigkeitskulturen mit Papierstreifen aus Gründen der Materialersparnis jeweils 6 etwa 0.5 cm breite Streifen von Bakterienrasen angeimpft, auf diese wurden die Phagenlysate bzw. ihre Verdünnungen mit einer sterilen Impföse aufgetupft (gespottet). Bei dem zweiten Tropftest zur Prüfung der Immunität wurde nach der Weichagartechnik gearbeitet, wobei nur ein lysogener Clon pro Platte zur Ausbildung des Bakterienrasens angeimpft wurde.

Die Immunität derjenigen lysogenen Clone, für deren Lysogenie sich schon durch die Tropftests Hinweise ergeben hatten, wurde quantitativ geprüft durch Titration der zugehörigen Phagenlysate auf diesen Zellkulturen. Zur Kontrolle wurde eine parallele Titration derselben Lysate auf den Indikatorbakterien durchgeführt.

Bei den Induktionsversuchen wurden die Flüssigkeitsversuche wie bei den Laborstämmen durchgeführt, allerdings ohne Auswaschen des Mitomycin-C. Bei den Plattentests wurden Antibiotica-Plättchen, die mit 2 bzw. 5 µg Mitomycin-C/ml vollgesaugt waren, nach 12 bis 20 Stunden Inkubation aufgelegt. Anschließend

wurde erneut autotroph inkubiert. Dabei waren allen lysogenen Kulturen Indikatorbakterien zum Nachweis der freigesetzten Phagen beigemischt.

10. Bestimmung der spezifischen Dichte

Zum Ansetzen der CsCl-Lösung in Phagenpuffer wurde nach der Formel

$$\text{Gewichtsprozent CsCl in Lösung} = 137.48 - \left(138.11 \frac{1}{\rho\, 25^{\circ}\,C}\right)$$

festes Cäsiumchlorid eingewogen (Winkler et al., 1972).
Für den Gleichgewichtslauf wurden in 5 ml-Nitrozellulose-Zentrifugenröhrchen (Beckmann, Best. Nr. 97711) 4.5 ml CsCl-Lösung und je 0.1 ml des zu analysierenden Phagen und des Referenzphagen pipettiert. Ein Titer von 1×10^6 bis 1×10^7 pro Phagentyp erwies sich als völlig ausreichend für die Durchführung des CsCl-Gleichgewichtslaufs. Mit dickflüssigem Paraffinöl (Merck, Art. Nr. 7160) wurde das restliche Leervolumen des Zentrifugenröhrchens aufgefüllt. Bis zur Einstellung des CsCl-Gradienten wurde 20 bis 24 Stunden bei 30 000 U/min in einer Ultrazentrifuge (Omega II 70 000, Titanrotor S52/61, Heraeus-Christ, Osterode) bei 10° C zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden in einem Entnahmegerät von unten mit einer dünnen Hohlnadel angestochen und 4 Tropfen (bei späteren Läufen nur 2 Tropfen) pro Fraktion entnommen. Der Verlauf des Dichtegradienten wurde durch Messungen der Brechungsindices jeder 3. Fraktion (bei späteren Läufen jeder 5. Fraktion) im Abbé-Refraktometer (Fa. Zeiss, Jena, Modell G) bei 25° C unter Benutzung einer Na-Dampf-Lampe ermittelt. Zur Umrechnung vom gemessenen Brechungsindex auf die zu bestimmende spezifische Dichte wurde die Formel von Weigle et al. (1959) benutzt:

$$\rho^{20} = 10.860 - 13.500$$

Die Verteilung der Phagen in den Fraktionen wurde durch Titration bestimmt. Dazu wurden zunächst 10^{-2}-Verdünnungen jeder Fraktion - CsCl kann bis zu einer Konzentration von 0.1 M die Adsorption der Phagen stören (E. Bade, pers. Mitteilung) - in einem Tropftest auf Indikatorbakterien nach einem Raster gespottet. Nachdem die Dichte der Phagen auf diesem Wege näherungsweise bestimmt war, wurde der genaue Phagentiter der Fraktionen des betreffenden Bereichs durch den üblichen Plaquetest bestimmt. Die graphische Ermittlung der spezifischen Dichte der Phagen aus den experimentellen Daten erfolgte durch gemeinsame Auftragung des Phagentiters und der spezifischen Dichte der einzelnen Fraktionen

11. Elektronenmikroskopische Techniken

Bei der direkten Beobachtung von Bakterienzellen, Bakteriophagen und von Phagenschwanzstrukturen im Elektronenmikroskop wurde ausschließlich das Verfahren der Negativkontrastierung angewandt (Brenner und Horne, 1959), bei dem der Kontrast der Umgebung und nicht der des Objektes selbst erhöht wird. Der geringe elektronenoptische Kontrast biologischer Objekte wird bei dieser Methode durch Zugabe von Schwermetallsalzlösungen verbessert, die als Füllmaterial in zugängliche Hohlräume eindringen. Bei der Verdunstung des Wassers lagern sich die für Elektronen undurchlässigen Schwermetallsalze um die Objekte herum ab, so daß eine zur Bilderzeugung ausreichende Beugung der Elektronenstrahlen gewährleistet wird. Auf diese Weise lassen sich Strukturdetails eindeutig abbilden. Die zu prüfenden Objekte erscheinen als hellere Partikel auf dunklem Hintergrund.

Die Präparation der Proben erfolgte nach der Valentine-Technik (Valentine et al., 1968): Eine mechanisch stabile, transparente Trägermembran, die zugleich strukturlos und ausrei-

chend widerstandsfähig gegen die auftreffenden Elektronen war, wurde durch Aufdampfen von Kohle unter Vakuum auf eine Schicht von gespaltenem Glimmer erhalten (Tikhonenko, 1970). Ein Stückchen dieses kohlebedampften Glimmers wurde auf die Oberfläche einer Suspension der abzubildenden Objekte gebracht, so daß die Partikeln an der Unterseite des abfloatierenden Kohlefilms adsorbieren konnten. Die Zeit der Adsorption betrug bei sehr geringen Partikelkonzentrationen 5 bis 10 Minuten und bei hohen Konzentrationen von 10^8 Partikeln und mehr pro ml etwa 30 bis 90 Sekunden. Nach genügender Adsorption wurde der Kohlefilm auf dem Glimmer in den zweiten Behälter mit der Kontrastierungslösung übertragen, wobei der Glimmer sich ablöste, während der Kohlefilm auf der Oberfläche schwamm. Als Kontrastierungslösungen kamen 1.7%ige Na-Phosphorwolframsäure mit einem Zusatz von 0.2% Saccharose - zur besseren Verteilung des Kontrastierungsmaterials - oder 4%ige Uranylacetat-Lösung mit einem pH-Wert von 4,8 zur Anwendung. Nach einer Kontrastierung von 1 Minute wurde ein 3 mm großes Trägerplättchen aus Kupfer (Grid), das ausgestanzte Fenster hatte, auf den Kohlefilm aufgelegt und beide wurden mit einer Pinzette aus dem Behälter entnommen. Zur besseren Anheftung des Kohlefilms an das Grid war dieses vorher mit einer klebenden Neoprenschicht versehen worden, die durch Eintrocknen einer aufgetropften Neopren-Toluol-Lösung erhalten wurde. Bevor der Kohlefilm, zu dessen Unterstützung das Kupfergrid unterlegt worden war, in den Strahlengang des Elektronenmikroskops gebracht werden konnte, mußte er vorsichtig auf Filterpapier entfeuchtet werden.

Ein Waschschritt mit destilliertem Wasser wurde für Kontrastierungen mit Uranylacetat ebenso zwischengeschaltet wie für Proben mit starkem Gehalt an organischem Material (Vollmedium).

Für erste Längenbestimmungen der neuisolierten Bakteriophagen wurden die Dimensionen von 3 bis 5 Partikeln ausgemessen. Die Analysen zur Induktion der Alcaligenes-Stämme wurden in einem Zeiss-Elektronenmikroskop (Modell EM952) durchgeführt. Für al-

le weiteren Untersuchungen stand ein Gerät der Firma Philips (Modell EM301) zur Verfügung. Die Vergrößerungen waren geeicht mit dem Abdruck eines optischen Kreuzgitters mit der Gitterkonstante 0.464 um. Als Negativmaterial für Mikrophotographien dienten Agfa-Gevaert 23 D 56 Planfilme.

12. Chemikalien

Für die Nährlösungen und die Substrattests wurden handelsübliche Chemikalien verwendet. Polyäthylenglykol-6000 und Mitomycin-C wurden von Serva - Feinbiochemica, Heidelberg, Rifampicin von Boehringer, Mannheim und Streptomycinsulfat von Merck, Darmstadt, bezogen.

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

A. Versuche mit Laborstämmen

Unter den fakultativ autotrophen Wasserstoffbakterien sind Pseudomonas ruhlandii, Pseudomonas flava, Pseudomonas facilis, Alcaligenes eutrophus und Alcaligenes paradoxus die bekanntesten gram-negativen Arten, während als gram-positive Vertreter dieser Gruppe hauptsächlich einige coryneformen Arten und wenige Bakterien der Gattung Nocardia beschrieben wurden. Bisher konzentrierten sich viele Arbeiten auf ein einziges Bakterium, Alcaligenes eutrophus, Stamm H16, dessen Physiologie eingehender untersucht wurde. Phagen für dieses bekannte Wasserstoffbakterium zum Zwecke späterer genetischer Studien zu isolieren, bot sich als reizvolle Aufgabe an. Frühere erfolglose Bemühungen lange vor Beginn dieser Arbeit ergaben jedoch schon den ersten Hinweis, daß sich für den favorisierten Stamm H16 intakte Phagen nur mit Schwierigkeiten isolieren lassen. Inzwischen hatte sich jedoch die Sammlung von Wasserstoffbakterien erheblich vergrößert; die meisten Stämme hatten sich als einander sehr ähnlich und der Spezies Alcaligenes eutrophus zugehörig erwiesen. Ein nochmaliger Versuch der Phagenisolation erschien deshalb nicht von vornherein aussichtslos, weil jetzt im hiesigen Labor außer dem Stamm H16 eine große Zahl verwandter, möglicherweise lysogener Bakterien gehalten wurden. Die eigenen Experimente wurden auf diese Bakteriengruppe beschränkt.

1. Suche nach Phagen mit klassischen Methoden

Wie isoliert man Phagen? - Bakteriophagen lassen sich grundsätzlich dort isolieren, wo auch ihre Wirtsbakterien anzutreffen sind. Temperente Phagen können allerdings und werden auch häufig direkt aus lysogenen Bakterienstämmen erhalten, sei es,

daß diese schon lange im Labor kultiviert oder erst frisch isoliert worden waren. Nicht in jedem Fall bedarf es jedoch der Neuisolation eines Phagen, wenn für ein Bakterium, das aus bestimmten Gründen favorisiert wird, ein Bakteriophage erwünscht ist. In seltenen Fällen kann ein schon in der Literatur beschriebener Phage auch denjenigen Bakterienstamm lysieren, den man aus bestimmten Gründen für weitere Untersuchungen bevorzugt.

1.1. Versuche zur Phagenisolierung aus Bodenproben

Boden- und Flüssigkeitsproben verschiedener Herkunft - unter anderem von dem Standort, an dem der Stamm H16 isoliert war - wurden für ein doppeltes Anreicherungsverfahren verwandt. Die zum Teil vereinigten Sterilfiltrate wurden im Spottest auf 20 ausgewählten Stämmen von Alcaligenes eutrophus auf das Vorhandensein von Phagen geprüft. In keinem Fall ließen sich erste Verdachtsmomente lytischer Aktivität in Wiederholungsversuchen bestätigen.

1.2. Versuche zur Erweiterung des Wirtsbereichs bekannter Phagen

Die virulenten Hydrogenomonas facilis Phagen HF, D, R, S133 und SH6 wurden im Spottest auf lytische Fähigkeiten gegenüber den Laborstämmen von Alcaligenes eutrophus geprüft. Plaques oder Lysiszonen konnten im Bakterienrasen der Laborstämme nicht festgestellt werden. Die 5 Phagen lysierten im parallel durchgeführten Kontrollversuch nur ihren Indikatorstamm, für den sie isoliert worden waren (Pootjes, 1964; Pootjes et al., 1966). Weitere in der Literatur schon beschriebene Phagen für andere Wasserstoffbakterien konnten im Rahmen dieses Versuchs

nicht getestet werden, weil sie von den betreffenden Autoren nicht zur Verfügung gestellt wurden.

1.3. Kreuztest zur Identifizierung lysogener Stämme

Die durch Behandlung mit Chloroform von lebenden Zellen befreiten Kulturfiltrate von 24 Stunden-Kulturen sämtlicher Alcaligenes-Stämme wurden als Lysate betrachtet. Sie wurden auf den Bakterienrasen derselben Stämme getropft, die somit gleichzeitig als mögliche Indikatorbakterien angesehen wurden. Dieser Tropftest mit 1296 Kombinationen erwies sich insofern als negativ, als nur einige schwierig zu reproduzierende Lysiseffekte beobachtet wurden. Insbesondere waren alle Bemühungen um die Übertragung der lytischen Aktivität erfolglos. In keinem Fall gelang die Selbstvermehrung des lytischen Agens durch Überimpfung auf frischen Bakterienrasen, wie bei Vorhandensein eines funktionsfähigen Phagen zu erwarten gewesen wäre.

1.4. Isolierung von sensiblen Indikatorbakterien aus möglicherweise lysogenen Kulturen

Das unbefriedigende Ergebnis des ausführlichen Kreuztestes mit den Laborstämmen mußte nicht unbedingt bedeuten, daß kein einziger der untersuchten Stämme lysogen war oder daß in keinem Fall ein Prophage aus seinem integrierten Zustand freigesetzt worden wäre. Die Vermutung war nicht von der Hand zu weisen, daß vielleicht Phagen in der Kulturflüssigkeit der Laborstämme anzutreffen waren, aber ihr Nachweis durch Plaque-Bildung am Mangel sensibler Wirtsbakterien gescheitert war.

Deshalb wurden die schon im Kreuztest benutzten Lysate nach ei-

ner von H. Stolp entwickelten Methode zur Isolierung von phagensensiblen Bakterien aus lysogenen Kulturen erneut benutzt (Stolp, 1957). Die Wahrscheinlichkeit, phagensensible Indikatorbakterien zu isolieren, sollte durch Versprühen des Lysats auf Einzelkolonien ausgewählter Alcaligenes-Laborstämme größer sein als bei einem Auftropfen auf einen zusammenhängenden Bakterienrasen. Die Prüfung der besprühten Platten nach erneuter Inkubation ergab jedoch im Phasenkontrastmikroskop keinerlei Schädigung oder Veränderung einzelner Kolonien, die auf Infektion durch einen Phagen aus den gesprühten Lysaten hingedeutet hätte.

2. Der Nachweis defekt lysogener Stämme in Alcaligenes eutrophus durch Induktionsversuche

Nach den mehrfach erfolglosen Bemühungen der Phagensuche mit ausgesprochen klassischen Methoden blieb als mehr oder weniger letzte Chance die Möglichkeit, Induktionsversuche mit den Laborstämmen durchzuführen. Unter Induktion versteht man in der Virologie das erzwungene Herauslösen der Prophagen aus ihrem integrierten Zustand im Chromosom der lysogenen Bakterien mit Hilfe bestimmter chemischer Mittel oder durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht. Dadurch kann die normale Rate der sich in lysogenen Bakterienkulturen spontan freisetzenden Phagen auf künstlichem Wege bisweilen beträchtlich erhöht werden.

2.1. Induktion der Laborstämme als "Screening" auf temperente Phagen

Das Antibioticum Mitomycin-C wurde nach seiner Beschreibung als äußerst effizientes Induktionsmittel durch Otsuji et al. (1959) häufig zur Isolierung temperenter Phagen benutzt. Da-

bei wurden die induzierenden Bedingungen zur erleichterten Auffindung der gesuchten Phagen in der Regel auf zwei Arten hergestellt:

1. Mitomycin-C wird in einer sehr geringen Konzentration von 0.1 µg/ml zum Zeitpunkt der Animpfung zu den flüssigen Bakterienkulturen gegeben und das zu prüfende Lysat nach 24 Stunden hergestellt (Sutton und Quadling, 1963).
2. Mitomycin-C wird in Dosen von 1 µg bis 10 µg/ml zu logarithmisch wachsenden Zellen gegeben und meistens nach mindestens 5 bis 60 Minuten Zellkontakt ausgewaschen (Endo et al., 1965; Yamamoto und Chow, 1968; Cannon et al., 1971).

Für die eigenen Versuche mit den Alcaligenes-Stämmen wurde daher mit Hilfe einer Konzentrationsreihe an 5 ausgewählten Bakterien die Zugabe von 2 bis 5 µg Mitomycin-C pro ml als die Konzentration bestimmt, die noch eine geringfügige Trübungszunahme erlaubte; denn eine stark hemmende Gabe von Mitomycin-C kann die Infektivität der durch Induktion entstandenen Phagen nahezu vollständig beseitigen (Sekiguchi und Takagi, 1960; Levine, 1961). Vor Aufnahme der Mitomycin-C-Induktionsexperimente im großen Stil wurden Modellversuche mit den ausgewählten Stämmen H1, H16 und J23 durchgeführt (siehe Abbildung 1, Seite 34). Eine gleichzeitig angewandte UV-Behandlung des Stammes H16 ließ eine Bestrahlungszeit von 15 bis 30 Sekunden als geeignet für eine eventuell zusätzlich durchzuführende Induktionsmethode erscheinen.

Schon bei diesem Vorversuch mit Mitomycin-C zeigte sich bis auf einen durch das Waschen und Resuspendieren der induzierten Zellen bewirkten Verschiebungseffekt praktisch kein Unterschied im Verlauf der Trübungszunahme der behandelten Kultur und der Kontrolle. Demnach war bei den drei ausgewählten Stämmen H1, H16 und J23 kein temperenter Phage induziert worden. Die charakteristische Trübungsabnahme eines durch Mitomycin-C induzierbaren lysogenen Bakteriums wurde jedoch auch in den anschließenden Induktionsversuchen mit den restlichen 33 Alca-

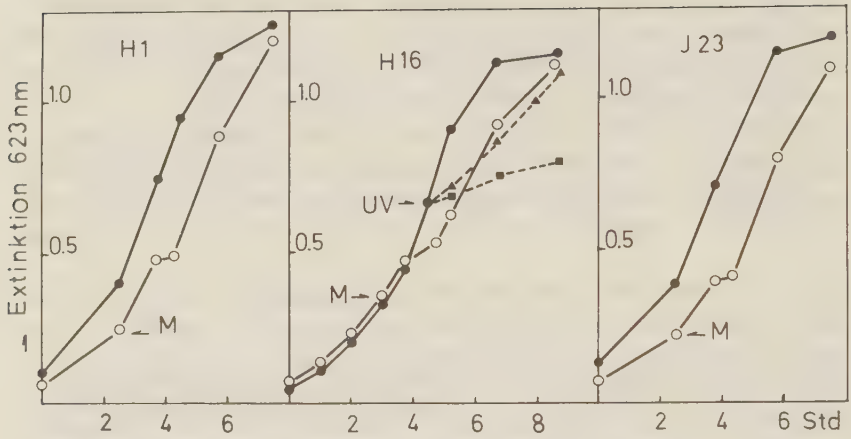


Abb. 1: Wachstum der Stämme H1, H16 und J23 von Alcaligenes eutrophus unter Einwirkung induzierender Agenzien.

Zur Induktion wurden Reagenzglas-NB-Kulturen der Stämme H1, H16 und J23 mit 3 µg Mitomycin/ml versetzt, nach 1 Stunde Kontakt gewaschen, in frischem Medium resuspendiert und mindestens 7 Stunden im Dunkeln nachinkubiert. Die Trübungsbestimmung erfolgte direkt im Reagenzglas im Bausch und Lomb-Photometer bei 623 nm.

Zur UV-Bestrahlung wurde die NB-Kultur des Stammes H16 zum angegebenen Zeitpunkt zur Hälfte (5 ml) in eine offene sterile Glasplatte gegeben und während der Bestrahlung aus einer Original Hanau-UV-Lampe im Abstand von 40 cm mit einem Magnetrührer durchmischt. Die bestrahlte Kultur wurde anschließend im Reagenzglas im Dunkeln nachinkubiert.

○——○ Zellkultur, mit 3 µg Mitomycin pro ml behandelt

●——● unbehandelte Kulturen, die als Kontrolle dienten

■- -■ Kultur von H16, 30 sec mit UV-Licht bestrahlt

▲- -▲ Kultur von H16, 15 sec mit UV-Licht bestrahlt

ligenes-Stämmen nicht in eindeutiger Form beobachtet. Aufgrund des Trübungsverlaufs konnte daher nicht auf die Lysis eines Stammes durch Induktion geschlossen werden. Weil solche eindeutigen Hinweise auf induzierbare lysogene Bakterien fehlten, wurde es als wenig aussichtsreich angesehen, Lysate aus den induzierten Kulturen herzustellen und diese in einem erneuten Tropftest gegen die Stämme ihrer Herkunft als potentielle Wirtsbakterien zu testen. Der Versuch einer Induktion durch Mitomycin-C und die Prüfung auf eine eventuelle Trübungsabnahme, wozu die Arbeit von Altenbern und Stull (1965) anregte, hatte somit für Alcaligenes eutrophus nicht zur Entdeckung von neuen temperenten Phagen geführt.

2.2. Überprüfung der Induktion mit elektronenoptischen Methoden

Den Anstoß zur Verwendung eines Elektronenmikroskops gaben schließlich Hinweise aus der Literatur. Bei Mitomycin-C-Behandlung von Clostridien wurde nach erfolgter Induktion zwar die erwünschte Lysis beobachtet, aber es gelang nicht, einen Plaquetest für die induzierten Phagen durchzuführen. Eine elektronenmikroskopische Kontrolle erbrachte den Nachweis, daß tatsächlich Phagen im Pellet der hochtourig zentrifugierten Kulturen nach der Induktion anzutreffen waren (Prescott und Altenbern, 1967). Weiterhin konnte ein allgemein transduzierender Phage für Rhizobium lupini, dessen genetische Aktivität zunächst auf eine Transformation hinzudeuten schien, erst im Elektronenmikroskop als Bakteriophage identifiziert werden, weil eine gleichzeitige lytische Aktivität nicht nachzuweisen war (Rösch, 1973).

Um einen zu hohen Arbeitsaufwand durch Prüfung jeder einzelnen induzierten Kultur zu vermeiden, wurde eine gemeinsame Nachinkubation durch Vereinigung eines Teils aller Kulturen

einer ganzen Induktionsserie durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Polyäthylenglykol - 6000-Fällung (PEG-Fällung). Bei der Untersuchung dieser PEG-Fällungen im Elektronenmikroskop konnten nach Negativkontrastierung keine vollständigen Phagen sichtbar gemacht werden; es wurden jedoch phagenähnliche Partikeln beobachtet.

Nach diesem ersten eindeutigen Befund wurden alle Alcaligenes-Stämme sorgfältig überprüft. Einerseits wurden die am Ende der Nachinkubation abzentrifugierten Zellen jeder induzierten Kultur nach partiellem Aufschluß mittels Ultraschall untersucht, andererseits wurde geprüft, ob nicht doch nach der Induktion Phagen in das Medium ausgeschieden worden waren. Insbesondere brachte die elektronenoptische Untersuchung der einzelnen Pellets von den hochtourig zentrifugierten Kulturflüssigkeiten den endgültigen Nachweis, daß die Stämme der Spezies Alcaligenes eutrophus keinen intakten Phagen in das Medium entlassen hatten. Überraschend häufig wurden jedoch besonders in den partiell aufgeschlossenen Zellen die gleichen phagenähnlichen Partikeln gefunden wie in den Vorversuchen. Diese Partikeln ließen sich unschwer als defekte Phagen klassifizieren, da sie immer ohne Phagenkopf und damit ohne Nukleinsäure anzutreffen waren. Von ihrer Struktur her waren zwei Typen zu unterscheiden: Phagenschwanz-ähnliche Partikeln, die in ihrer Form langen, schmalen Röhren glichen und solche, die abgebrochenen Schwänzen kontrahierbarer Phagen ähnelten, weshalb sie auch als Inco-Partikeln("incomplete phage") bezeichnet werden können (Lotz und Mayer, 1972). Außerdem konnte von einer eindeutigen Verteilung der beiden Typen gesprochen werden. Die langen Hohlröhrchen wurden fast ausschließlich in den präparierten ganzen Zellen angetroffen, während der zweite Partikeltyp nur in den Kulturflüssigkeiten festgestellt wurde (siehe Tabelle 2, Seite 39).

Bei den langen Höhlröhrchen beträgt der äußere Durchmesser 24 nm und der innere Durchmesser 6.0 bis 6.5 nm. Die Tubuli

haben damit einen äußeren Durchmesser in der Größenordnung von kontrahierten Schwanzscheiden und ähneln den "polysheaths" von T-geraden Bakteriophagen (Kellenberger und Boy de la Tour, 1964; Sakar et al., 1964). Die Bezeichnung polysheath, die zuerst für die in Längsrichtung polymerisierten Schwanzscheiden dieser E.coli-Phagen geprägt worden ist, wurde für die neu gefundenen tubulären Strukturen in den Zellen der Stämme von Alcaligenes eutrophus übernommen. Sie erscheinen dort oft als ziemlich starre Gebilde und erstrecken sich beispielsweise bei dem Stamm H16 mit einer Längenausdehnung von maximal 2000 nm fast über die gesamte Länge der Zelle. Das konnte elektronenmikroskopisch an partiell lysierten Zellen gezeigt werden, welche ein Eindringen der Kontrastierungslösung erlaubten (siehe Abbildung 2).

Abb. 2: Polysheaths in einer partiell lysierten Zelle von Alcaligenes eutrophus Stamm H16.
PWS, x 54800, Maßstab=2000Å

Obendrein zeigten die Polysheaths in Präparaten, in denen sie mitunter zufällig in der Aufsicht auf ihre Längsachse abgebildet waren, eine 12fache Rotationssymmetrie (Mauruschat, 1974), wie sie von Moody für die kontrahierte Scheide und die Polysheath-Struktur des T4-Phagen beschrieben wurde (Moody, 1967). Insgesamt zeigte sich, daß unter künstlichen Induktionsbedingungen etwa die Hälfte der Alcaligenes-Stämme solche Polysheaths produzierte.

Zum Vergleich wurden 4 Monate alte tiefgefrorene Zellen des Stammes H16 und seiner Mutante PHB-4 geprüft. Die Präparationen beider Zellproben wiesen bei elektronenmikroskopischer Betrachtung zahlreiche Polysheaths in der charakteristischen Längenausdehnung auf. Damit war eindeutig festgestellt, daß der Stamm H16 und seine PHB-freie Mutante unter Standardbedingungen der autotrophen Anzucht im 10 l - Braun - Fermenter in der gleichen Weise Polysheaths produzierten wie unter den im Labor gewählten künstlichen Induktionsbedingungen der Mitomycin-C-Experimente.

Im Gegensatz zu den Polysheaths wurde der zweite Typ der defekten Phagen weit weniger häufig angetroffen. Nur ein Sechstel aller untersuchten Alcaligenes-Stämme (siehe Tabelle 2, Seite 39) produzierte Partikeln, die kompletten Phagenschwänzen glichen - und zwar solchen mit kontrahierbarer Scheide. Im elektronenmikroskopischen Bild hatten diese Partikeln das Aussehen von zwei ineinandersitzenden Zylindern, deren innerer, Core genannt, von der kontrahierbaren Scheide umgeben war. Diese war nicht immer gleich lang, je nachdem, ob sie sich im ausgestreckten oder kontrahierten Zustand befand,und hatte manchmal eine Basisplatte an dem einen Ende. Seltener zeigten sich auch Beispiele von Phagenschwänzen, bei denen im Verlauf der Negativkontrastierung der Core herausgerutscht war; in diesen Fällen waren nur noch kontrahierte Scheiden ohne den inneren Zylinder zu sehen. Die als defekt lysogen anzusprechenden Alcaligenes-Stämme produzierten möglicherweise Phagenschwänze unterschied-

Tab. 2: Ergebnis der elektronenoptischen Überprüfung der Induktionsversuche mit Alcaligenes eutrophus

Bakterium	Vorkommen der phagenschwanzähnlichen Partikeln in part.lys.Zellen	Menge	im Medium	Menge
B19	-		-	
B34	-		-	
C3A	-		-	
D1A	-		-	
D2	Polysheath	++	-	
D6A	Polysheath (?)		-	
E3	Polysheath	++	-	
G1A	-		-	
G3A	-		-	
G6	-		-	
G8	-		Inco	++
G9	-		Inco (?)	
G15	-		Inco	+++
			Polysheath	+
G16A	-		-	
G27	-		Inco	++
G29	-		Inco	++
G30	-		Inco	+++
			Polysheath	+
H1	Polysheath	+	-	
H2	Polysheath	+	-	
H6	Polysheath	+	Inco	+
H16	Polysheath	+++	-	
H20	-		-	
A.eutrophus	-		Polysheath	+
J5	Polysheath	+	-	
J8	Polysheath	+	-	
J9	Polysheath	+	-	
J10	Polysheath	+	-	
J11	Polysheath	+	-	

Bakterium	Vorkommen der phagenschwanzähnlichen Partikeln in part.lys.Zellen	Menge	im Medium	Menge
J20	-		-	
J23	Polysheath	++	-	
J29	Polysheath	++	-	
J33	-		-	
J35	Polysheath	++	-	
J36A	Polysheath	+	-	
L8	Polysheath	++	-	
L10	-		-	

\- = ohne Phagenschwanzpartikel in den Zellen oder im Medium

\+ = minderer Gehalt, mindestens ein Partikel beobachtet

++ = mittlerer Gehalt

+++ = hoher Gehalt

licher Länge. Die Messungen für die Länge unkontrahierter Schwänze ergaben 1600 Å bis 1800 Å, während für die kontrahierten Schwanzpartikeln 1250 bis 1500 Å berechnet wurden. Es muß noch geklärt werden, ob die unterschiedlich langen Phagenschwänze von denselben Bakterienstämmen produziert werden oder ob die Phagenschwänze unterschiedlicher Länge von verschiedenen Bakterien stammen.

B. Simultanisolierung von intakten Phagen und Wasserstoffbakterien mit anschließender Charakterisierung der Bakteriophagen und ihrer Wirtsbakterien

Die klassischen Methoden der Phagensuche, die bei Enterobakterien und auch bei vielen pathogenen Organismen ohne weiteres zur erfolgreichen Isolierung von Bakteriophagen für spätere genetische Studien führen, erschienen nach den enttäuschend verlaufenen Experimenten mit den Laborstämmen höchst ungeeignet für Knallgas-Bakterien. Daher wurden alle Versuche eines getrennten Nachweises der Partner des Systems Phage - Bakterium aufgegeben. Ein Erfolg wurde jetzt ausschließlich von einer gleichzeitigen Isolierung der "Knallgas"-Phagen und ihrer natürlichen Wirtsbakterien erwartet. Die Ergebnisse der Simultanisolierungen und die Experimente zur Charakterisierung sowohl der neuen Phagen wie auch ihrer Wirtsbakterien werden im folgenden dargestellt.

1. Experimente zur gleichzeitigen Isolierung aus demselben Standortsmaterial

Um das System Phage - Wirtsbakterium ungeteilt aus seiner natürlichen Umgebung zu isolieren und zu identifizieren, wurden die für die Knallgasbakterien üblichen Anreicherungsmethoden nach bestimmten Gesichtspunkten modifiziert. Es wurde nach folgendem Verfahren vorgegangen:

1. Gut wachsende, auch für Massenkulturen geeignete Wasserstoffbakterien sollten dadurch selektiert werden, daß die Inkubationen von vornherein in 1 l-Erlenmeyer-Schüttelkolben mit Schikanen durchgeführt wurden, die nachweislich eine erheblich bessere O_2-Aufnahmerate gewährleisten als die normalen Schüttelkolben (Finn, 1954) oder gar die für Anreicherungen häufig benutzten großen Reagenzgläser mit dem unten kugelförmig erweiterten Boden.

2. Es wurde mit einem Mindestflüssigkeitsvolumen von 300 bis 400 ml gearbeitet. So konnte ein möglicherweise in die Anreicherungskultur mitgeschleppter Bakteriophage, der sich entweder als virulenter Phage über die gleichzeitig in die Anreicherungskultur geratenen Wirtsbakterien oder als Prophage mit den entsprechenden lysogenen Bakterien vermehren sollte, durch differenzierte Zentrifugation immerhin um einen Faktor von 100 konzentriert werden. Eine derartige Verbesserung des Titers der "Lysate" aus den einzelnen Anreicherungen konnte deshalb von entscheidender Bedeutung werden, weil in einem zweiten Arbeitsschritt die Phagen mit Hilfe des Elektronenmikroskops gesucht wurden. Dabei sollte ein Lysat mindestens 10^5 bis 10^6 Partikeln pro ml enthalten, um die Identifizierung von Phagen im Elektronenmikroskop nicht zu einer reinen Sisyphusarbeit werden zu lassen.

3. Isolierungen von Wasserstoffbakterien wurden in der Regel nur von den Anreicherungen vorgenommen, deren "Lysate" bei der Prüfung im Elektronenmikroskop als phagenpositiv bewertet worden waren.

4. Die phagenpositiven Lysate wurden auf die als Bakterienrasen benutzten frisch isolierten Wasserstoffbakterien derselben Anreicherung getropft, um für die Möglichkeit, einen Plaquetest durchführen zu können, erste Hinweise zu erhalten. Damit sichergestellt war, daß es sich bei den so identifizierten Wirtsbakterien wirklich um Wasserstoffbakterien handelte, wurden die Platten ausschließlich autotroph inkubiert. War also an den Stellen des Auftropfens Lysis im Bakterienrasen zu beobachten und gelang der anschließende Plaquetest, so ließ sich der betreffende Bakterienstamm als Indikator für den Phagen verwenden. Gleichzeitig war damit - nach den enttäuschenden Erfahrungen mit der defekten Lysogenie in Alcaligenes eutrophus gewährleistet, daß die jeweiligen im Elektronenmikroskop gesichteten Phagenpartikeln auch als funktionsfähige Bakteriophagen zu handhaben waren.

Insgesamt wurden nach dem soeben beschriebenen Verfahren 48 Anreicherungen durchgeführt. Ca. 150 bis 200 Bakterienstämme wurden isoliert und als potentielle Indikatorbakterien im Plaquetest nach der Weichagar-Technik geprüft. Im Anhang dieser Arbeit ist eine ausführliche Tabelle angefügt, die sämtliche Daten über die genaue Herkunft der Proben und eine Auflistung der neuisolierten Wasserstoffbakterien enthält.

Bei der Prüfung im Elektronenmikroskop wurde fast die Hälfte der Anreicherungen als phagenpositiv bewertet. Nahezu alle Phagentypen, die Bradley (1967) in seinem System der morphologischen Klassifizierung von Bakteriophagen aufgeführt hat, wurden in den Lysaten festgestellt, sogar ein Filamentphage konnte beobachtet werden. Am häufigsten allerdings waren Phagen mit kontraktilem Schwanz und solche mit langem flexiblen Schwanz. Manche Lysate wiesen auch zwei und einige sogar drei morphologisch verschiedene Phagen auf. Außerdem enthielt eine Reihe von Anreicherungen noch defekte Phagen. Ihrer Struktur nach ließen sich dabei dieselben Typen von phagenschwanzähnlichen Partikeln unterscheiden wie sie im Teil A dieser Arbeit für die Stämme von Alcaligenes eutrophus beschrieben wurden.

Im Lysat der Anreicherungen 43 und 44 tauchten jedoch defekte Phagenpartikeln auf, die wegen ihrer eigenartigen Morphologie besondere Aufmerksamkeit erregten. Es handelte sich dabei um Tubuli mit helicaler Struktur, aus denen seitlich lange Fäden wie Haare wuchsen (siehe Abbildung 3, Seite 44). Einige dieser Tubuli wurden mit einem Ende an Zellwandreste adsorbiert vorgefunden.

Abb. 3: Phagenpartikel aus den Anreicherungen 43 und 44
Uranylac., x 180000, Maßstab = 1000 Å

Aus der großen Auswahl der elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Phagen und der isolierten Wasserstoffbakterien konnten jedoch nur wenige intakte Phagen - Wirtsbakterien - Systeme identifiziert werden (siehe Tabelle 3). Die Anreicherung 43 erbrachte Plaques auf drei getrennt isolierten Wasserstoffbakterien. Die Phagen der Anreicherung 43 wurden zum Teil ausführlicher untersucht, da der Verdacht bestand, daß hier vielleicht dreimal die gleichen Phagen isoliert worden waren.

Tab. 3: Ergebnis der simultanen Isolierungen von Phagen und Knallgasbakterien aus 48 Anreicherungen

Anreicherung	intakter Phage	Wirtsbakterium
2	ga	GA
22	gb	GB
34	gc	GC
43	gd, ge, gf	GD, GE, GF

2. Charakterisierung der neuisolierten Bakteriophagen

Durch die Simultanisolierungsmethode war also eine Reihe von neuen Phagen für Wasserstoffbakterien isoliert worden. Weil jedoch nicht ohne weiteres vorauszusehen war, welche der neuen Phagen am besten für spätere genetische Studien bei den Wasserstoffbakterien zu verwenden waren, sollten die Versuche zur Charakterisierung mit allen neuen Phagen durchgeführt werden. Möglicherweise würde sich dabei herausstellen, daß ein Teil der neuisolierten Phagen nur sehr schwierig im Labor zu handhaben war und damit für weitere Untersuchungen ausfiel.

2.1. Identifizierung und Diskriminierung der Phagen durch Plaquemorphologie und Wachstum

Von der elektronenmikroskopischen Vorprüfung der Erstlysate aus den Anreicherungen war bekannt, daß diese häufiger mehrere Phagentypen enthielten, die allein schon aufgrund ihrer morphologischen Struktur zu unterscheiden waren. Deshalb wurden bei der Reinigung der Phagen durch wiederholte Titration von Einzelplaques Größenverteilung und Aussehen der Plaques während der Titrationen sorgfältig beobachtet und miteinander verglichen. Auf diese Weise ließen sich die Phagen gd1 und gd2, die zunächst beide in einem gemeinsamen Lysat auf dem Bakterium GD vermehrt worden waren, voneinander trennen (Abbildung 4, Seite 47). Beim Lysat des Phagen ga konnte dagegen eine derartige Identifizierung weiterer Phagen nicht durchgeführt werden, obwohl hier eine sehr heterogene Größenverteilung der Plaques schon sofort bei der ersten Titration und danach immer wieder beobachtet wurde.

Die Reinigung der neuisolierten Phagen nach der Einzelplaque-Technik wurde unter autotrophen Bedingungen vorgenommen; denn sämtliche Phagen waren wegen der mehr als 1 mm großen Plaques unter diesen Bedingungen zuvor mühelos isoliert worden. Bei der Inkubation der Weichagar-Platten unter einer Atmosphäre von O_2, H_2 und CO_2 bei 30° C ließ sich der Plaquetest für alle Phagen spätestens nach drei Tagen auswerten. Die Plaques des Phagen gd1 auf dem Stamm GD konnten jedoch schon nach zwei Tagen gezählt werden und hatten dann auch annähernd ihre endgültige Größe erreicht.

Im einzelnen ergaben sich folgende Daten zur Plaquemorphologie der neuen Phagen:
Der Phage ga aus der Anreicherung 2 produziert auf dem Stamm GA 3 bis 4 mm große, leicht trübe Plaques mit äußerst differenzierter Struktur (Abbildung 5 A, Seite 49). Man kann aufeinanderfolgende Ringzonen erkennen, die mit Zellen bewachsen

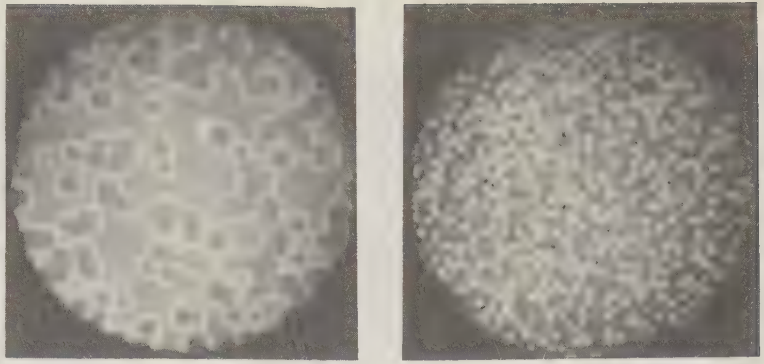


Abb. 4: Plaquemorphologie der Phagen gd1 (Abbildung 4 A) und gd2 (Abbildung 4 B) aus der Anreicherung 43, die beide auf dem Stamm GD plattieren, auf Schlegels-Mineralmedium nach drei Tagen Inkubation unter einer Gasatmosphäre von 10 % CO_2, 10 % O_2 und 80 % H_2 bei 30° C. Die Phagen wurden in eine Weichagarlösung mit Kaserer Mineralmedium gegeben. Die Indikatorbakterien waren in NB-Medium angezogen.

sind oder durch lytische Wirkung der Phagen gegenüber dem umliegenden Bakterienrasen unterschiedlich stark aufgehellt erscheinen.

Der Phage gb aus der Anreicherung 22 plattiert auf dem Stamm GB mit bis zu 3 mm großen Plaques, die einen gleichmäßigen, ziemlich trüben Hintergrund haben (Abbildung 5 B, Seite 49). Diese Plaques heben sich relativ wenig vom Bakterienrasen ihrer Umgebung ab, insbesondere, wenn dieser nicht so gut entwickelt ist, weil beispielsweise der Plaquetest unter suboptimalen Bedingungen durchgeführt wurde.

Aus der Anreicherung 34 wurde der Phage gc isoliert, der auf dem Stamm GC nur verhältnismäßig kleine Plaques mit einem Durchmesser von 1.5 bis 2.0 mm zu bilden vermag (Abbildung 5 C, Seite 49). Die Plaques besaßen in ihrem Inneren einen deutlich ausgebildeten Zellhof und daran anschließend eine helle Lysiszone. Diese äußere Lysiszone erschien bei schräger Aufsicht auf die Platte wie eingegraben im Bakterienrasen, und die Plaques waren insgesamt erhaben. Bei allen Titrationen waren regelmäßig kleinere Plaques (Durchmesser 1 mm und kleiner) vorhanden, die offensichtlich infolge verspäteter Adsorption noch nicht vollständig ausgebildet waren und denen der deutlich sichtbare innere Zellhof fehlte.

Drei Phagen mit ziemlich gleicher Plaquemorphologie, gd1, ge und gf wurden aus der Anreicherung 43 isoliert, von denen in der Abbildung 4 A (Seite 47) nur die Plaques des Phagen gd1 gezeigt werden. Diese Phagen produzierten auf ihren Indikatorstämmen GD, GE und GF Plaques mit ähnlich gediegener Struktur, wie sie zuerst bei dem Phagen ga aus der Anreicherung 2 zu beobachten war. Allerdings war dabei die Reihenfolge der hellen und dunklen Zonen innerhalb der Plaques verändert. Es wurde nämlich - von innen nach außen gesehen - ein Lysishof von schwacher Helligkeit mit einem Durchmesser von 1 bis 2 mm ausgebildet; daran schlossen sich mit Zellen bewachsene, ring-

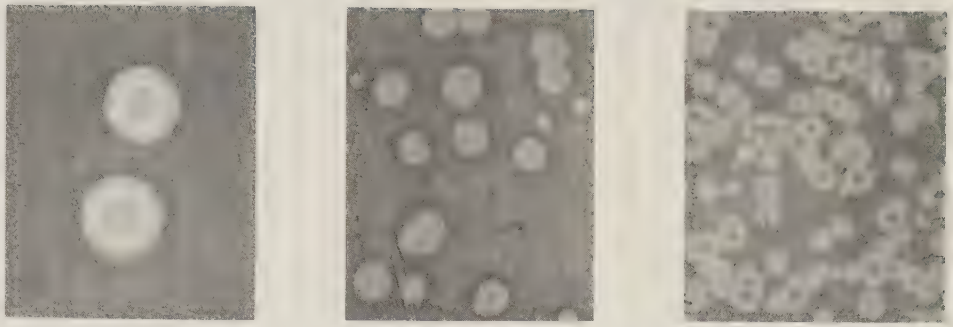


Abb. 5: Plaquemorphologie des Phagen ga aus der Anreicherung 2 (Abbildung 5 A), des Phagen gb aus der Anreicherung 22 (Abbildung 5 B) und des Phagen gc aus der Anreicherung 34 (Abbildung 5 C). Der Plaquetest wurde auf Platten mit Schlegels Mineralmedium in der Unterschicht und Kaserers Mineralmedium in der Weichagarschicht durchgeführt. Die Indikatorbakterien waren in NB-Medium angezogen. Die Platten wurden drei Tage bei 30° C unter einer Gasatmosphäre von 10 % O_2, 10 % CO_2 und 80 % H_2 inkubiert.

förmige dunklere Zonen an; abschließend war ein fast völlig zellfreier - verglichen mit dem Bakterienrasen der Umgebung - sehr heller äußerer Lysisrand deutlich ausgeprägt. Die Durchmesser des Phagen gd1 auf dem Stamm GD und des Phagen ge auf dem Stamm GE schwankten zwischen 4 und 5 mm. Der Phage gf lysierte den Stamm GF mit Riesenplaques, bei denen nicht selten ein Durchmesser von 7 mm gemessen wurde.

Im Vergleich dazu bildete der Phage gd2 kleinere Plaques mit einem Durchmesser von 1.5 mm bis höchstens 2 mm. Diese hoben sich sehr hell gegen den Bakterienrasen ab und erschienen bei Betrachtung der Platte in schräger Aufsicht völlig lysiert (Abbildung 4B, Seite 47). Bei den am besten ausgebildeten Plaques war jedoch im Durchlicht ein schwach ausgebildeter innerer Zellhof erkennbar.

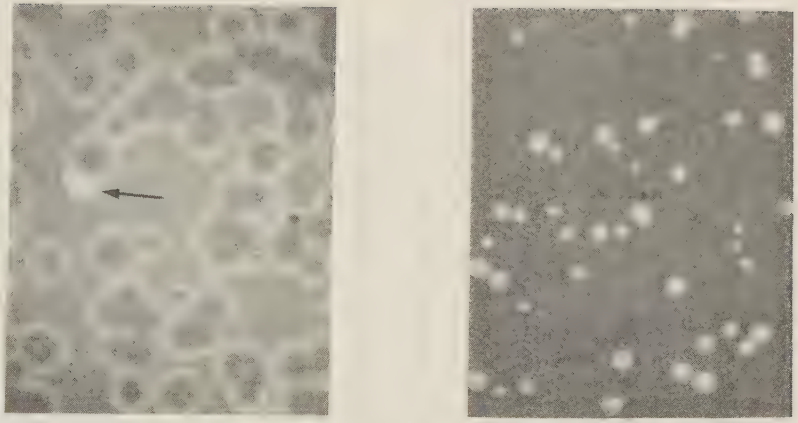
2.2. Einfluß der hetero- und autotrophen Inkubationsbedingungen auf Plaquemorphologie und Wachstum

Aus Gründen der Arbeitserleichterung wurde zunächst nach einem heterotrophen Medium gesucht, auf dem sämtliche neuisolierten Phagen Plaques bilden konnten. Es war jedoch keines der getesteten 10 Medien für einen gemeinsamen heterotrophen Plaquetest aller Phagen geeignet. Umgekehrt aber ergab sich mit bestimmten Medien ein durchgehender Mißerfolg bei den Versuchen für einen heterotrophen Plaquetest. NB-Medium beispielsweise verhinderte für alle 7 Phagen die Plaquebildung vollkommen und wirkte sogar - supplementiert zu sonst geeigneten Medien - so stark hemmend, daß höchstens winzige, in der Regel nicht zählbare Plaques zu erkennen waren. Dabei war der Titer der Phagen in dem einen Fall, wo er mit einer gewissen Genauigkeit überhaupt bestimmt werden konnte (Phage gd1 auf mit NB supplementiertem Gluconat-Mineralmedium), nicht reduziert gegenüber der Auszählung von einem optimalen heterotrophen Plaquetest.

Von allen ausprobierten heterotrophen Medien erschien 0.1 bis 0.2 %iges Na-Gluconat-Mineralmedium noch am günstigsten, weil es wenigstens für alle 4 Phagen der Anreicherung 43 einen auszählbaren Plaquetest ermöglichte. Beinahe ebenso gut, d.h. mit 0.5 bis 2.0 mm großen Plaques, plattierten diese Phagen mit Mineralmedium, dem 0.15 % Glycerin, 0.2 % Saccharose oder 0.5 % Fruktose bzw. Glucose zugesetzt worden war.

Die Suche nach einem geeigneten heterotrophen Plaquetest für die Phagen der Anreicherung 2, 22 und 34 wurde fortgesetzt, da inzwischen ein Substrat-Test - bei der parallel durchgeführten Charakterisierung der neuisolierten Wirtsbakterien - abgeschlossen worden war, bei dem sich Galaktose als gut geeignetes Wachstums-Substrat für die Stämme GA, GB und GC erwiesen hatte. Auf 0.5 %igem Galaktose-Mineralmedium plattierten die Phagen tatsächlich gut, bis auf den Phagen gc, bei dem die höchstens 1 mm großen Plaques nur bei sorgfältigster Prüfung der Platten ausgezählt werden konnten.

Insgesamt aber war die völlig neuartige Morphologie nahezu aller Plaques das auffallendste Merkmal bei der heterotrophen Vermehrung der Phagen. Am deutlichsten zeigten sich diese Unterschiede zwischen autotropher und heterotropher Inkubation bei drei Phagen (gd1, ge und gf) aus der Anreicherung 43, die - mit Knallgas und Kohlendioxyd inkubiert - Plaques von 5 bis 7 mm Durchmesser produzierten. Die Abbildung 6 (Seite 52) stellt autotrophe Riesenplaques des Phagen gd1 solchen gegenüber, die derselbe Phage auf Gluconat-Mineralmedium bildet. Niemals (mit Ausnahme der sowieso schon kleinen Plaques des Phagen gd2) waren unter heterotrophen Bedingungen die Durchmesser der Plaques auch nur annähernd so groß wie bei autotropher Inkubation; im besten Falle waren die Plaques halb so groß. Der Phage gd2 war auch der einzige, dessen Plaquemorphologie von den Inkubationsbedingungen nahezu unabhängig war. Alle anderen Phagen entwickelten bei heterotrophem Wachstum durchweg Plaques, die sich mit ihrem gleichmäßigen inneren



A B

Abb. 6: Abhängigkeit der Plaquemorphologie von den Inkubationsbedingungen

6 A: Phage gd1 nach 3 Tagen Inkubation der Platten bei 30° C unter einer Gasatmosphäre von 10 % O_2, 10 % CO_2 und 80 % H_2, Unterschichtagar: Schlegels Mineralmedium, Weichagar: Kaserers Mineralmedium. Die Abbildung zeigt außerdem eine "clear-plaque"-Mutante (siehe Pfeil).

6 B: Phage gd1 nach 2 Tagen heterotropher Inkubation bei 30° C, Unterschichtagar: Schlegels Mineralmedium supplementiert mit 0.2 % Nagluconat, Weichagar: Kaserers Mineralmedium

Lysishof fast so hell von dem umliegenden Bakterienrasen abhoben, wie man es gewöhnlich von den Plaques virulenter Phagen erwartet. Abweichend davon wurden nur mit 0.5 %igem Fruktose-Mineralmedium auf dem Stamm GF 3 mm große Plaques mit deutlich sichtbarem inneren Zellhof und auf dem Stamm GE 2 mm große Plaques mit erkennbarem inneren Zellhof ausgebildet. Sehr helle Lysiszonen bildeten den Abschluß der Plaques nach außen. Aber selbst in diesen Fällen konnte nur andeutungsweise von Ähnlichkeiten in der Morphologie heterotroph oder autotroph gewachsener Plaques gesprochen werden.

Die Bildung von Plaques war auf den heterotrophen Platten meist schon nach einem Tag Inkubation bei 30° C zu erkennen. Nach zwei Tagen hatten die Plaques ihre endgültige Ausformung erreicht. Damit war der heterotrophe Plaquetest auf jeden Fall wesentlich eher auswertbar als eine Titration mit Mineralplatten unter autotrophen Bedingungen - ganz abgesehen von der erleichterten Durchführung der Experimente, wenn auf die umständliche autotrophe Inkubation verzichtet werden konnte. Da es aber nicht gelungen war, einen gemeinsamen heterotrophen Plaquetest für alle 7 Phagen zu entwickeln, mußten trotzdem die meisten nachfolgenden Experimente zur Charakterisierung der neuen Phagen auf Mineralplatten durchgeführt werden, die unter einer Gasatmosphäre von O_2, H_2 und CO_2 inkubiert wurden.

2.3. Stabilität der Phagen und Gewinnung von Lysaten

Schon während der vierzehntägigen Anreicherungsprozedur in flüssigem Mineralmedium ließen alle Phagen die zu ihrer Isolierung notwendige Stabilität erkennen. - Das Mineralmedium enthielt $MgSO_4$ und $CaCl_2$ in einer Konzentration von etwa 0.1 mM. - Für die hochtourige Zentrifugation der im Elektronenmikroskop auf Vorhandensein von Phagen zu prüfenden "Lysate" wurde vorsichtshalber ein Saccharose-"Polster" unterlegt; es wurde je-

doch nicht genauer untersucht, in welchem Maße dadurch tatsächlich ein Zerfall der neugewonnenen Phagen verhindert wurde. Zwei dieser Erst-"Lysate" (Phagen aus Anreicherung 2 und Phagen aus Anreicherung 22) enthielten jedenfalls noch nach einem Jahr Aufbewahrung bei +4° C infektiöse Phagenpartikeln. Bei der Sterilisierung der Lysate ließ sich Chloroform oder Ultrafiltration anwenden, ohne daß eine Beeinträchtigung der Stabilität der Phagen bemerkbar wurde. Dagegen führte bei den kontrahierbaren Phagen ga und gb eine Direktkontrastierung für die Elektronenmikroskopie durch Auftropfen von Phosphor-Wolframsäure auf die Plaques und anschließendes mehrmaliges Aufsaugen mittels einer Pasteur-Pipette zur sofortigen Abtrennung der Phagenschwänze. Insgesamt zeigten alle Phagen sowohl im Mineralmedium nach Schlegel et al. (1961) oder Kaserer (1906) als auch im Phagenpuffer nach Clowes und Hayes (1968), der mit 0.01 % Gelatine supplementiert war, eine hinreichende Stabilität, wenn sie bei +4° C aufbewahrt wurden.

Lediglich der Phage gc verlor auch im Gelatine-Phagenpuffer nach mehreren Wochen seine Infektivität vollkommen und blieb für spätere Untersuchungen nur deshalb erhalten, weil er aus glücklicherweise schon vorhandenen lysogenen Bakterienstämmen reisoliert werden konnte. Die Überprüfung eines solchen nicht mehr infektiösen Lysats des Phagen gc im elektronenmikroskopischen Bild zeigte sämtliche Phagenpartikeln ohne Schwänze; diese waren nicht nur abgetrennt, sondern erschienen sogar weitgehend aufgelöst. Nur selten wurden ganze Schwänze mit erhaltener Struktur gesehen. Ebenfalls war der Phage gc der einzige der 7 Phagen, der sich bei der Bestimmung der spezifischen Dichte im CsCl-Gradienten nach der Fraktionierung nicht mehr titrieren ließ und höchstwahrscheinlich vollkommen abgetötet worden war.

Bei der Gewinnung von Lysaten wurde bis auf den Fall der Reisolierung des Phagen gc nicht mit Flüssigkeitskulturen gearbeitet. Unterschiedlich gute Lysate wurden bisher mit zwei

Variationen der Plattenmethode erhalten:

1. Durch Abschwemmen von Petrischalen mit jeweils 7 ml Phagenpuffer und anschließender niedrigtouriger Zentrifugation wurden für die einzelnen Phagen Lysate mit folgendem Titer erhalten: Phage ga = 2×10^5/ml; Phage gb = 1×10^7/ml; Phage gd1 = 8×10^7/ml; Phage gd2 = 5×10^9/ml; Phage ge = 2×10^9/ml und Phage gf = 1×10^9/ml. In einem Wiederholungsversuch wurde eine dreifache Menge Indikatorbakterien der späten log-Phase in den Weichagar gegeben und autotrophe Platten mit nur 1.2 % Agar in der Unterschicht benutzt, damit dem Weichagar mit seinem semikonfluent lysierten Bakterienrasen weniger Feuchtigkeit entzogen wurde. Von derart hergestellten Platten ließ sich durch Abschwemmen mit 4 ml Phagenpuffer eine Verbesserung der Titer erreichen mit 2×10^6/ml für den Phagen ga, 2×10^9/ml für den Phagen gb und 1×10^9/ml für den Phagen gc. Für letzteren ergab eine zweistündige hochtourige Zentrifugation nochmals eine Steigerung auf 5×10^9/ml.
2. Durch Abkratzen des Weichagars und anschließende niedrigtourige Zentrifugation wurden Lysate erhalten, deren Titer meistens um einen Faktor 10 höher lag als bei der ersten Versuchsserie nach der Abschwemmungsmethode. Dabei waren die Platten für die Phagen ga und gb wieder autotroph bebrütet worden. Für den Phagen gd2 und die Phagen ge und gf wurden 0.2 % ige Gluconat-Mineralmedium-Platten bei 25° C inkubiert, um eine optimale Vermehrung der Phagen bei langsam wachsendem Bakterienrasen zu gewährleisten. Für die so erhaltenen Lysate wurden folgende Titer bestimmt: Phage ga = 1.2×10^6/ml; Phage gb = 3×10^8/ml; Phage gd2 = 3×10^{10}/ml; Phage ge = 1×10^{10}/ml und Phage gf = 5×10^9/ml.

Daß durch eine vielseitigere Variation der Experimente noch eine weitere Erhöhung des Titers der einzelnen Lysate erreicht werden kann, zeigte ein Kontrollversuch mit dem Phagen gd1: Ein Lysat mit dem Titer 1×10^9/ml wurde allein schon aus 20 großen autotroph gewachsenen Plaques erhalten, die steril aus

dem Weichagarbakterienrasen ausgestochen, 2 Stunden in 2 ml Phagenpuffer suspendiert und anschließend sterilfiltriert wurden.

Damit konnten - teils autotroph, teils heterotroph - für 6 der neuisolierten Phagen Lysate mit einem Mindesttiter von 1×10^9/ml hergestellt werden. Nur bei dem Phagen ga ließ sich die Lysatgewinnung kaum optimieren, und der höchste erreichbare Titer war mit 2×10^6/ml sehr niedrig. Das beste Lysat überhaupt wurde mit dem Phagen gd2 von heterotrophen Platten gewonnen und enthielt 3×10^{10} infektiöse Partikeln pro ml.

2.4. "Efficiency of plating" und Adsorption der Phagen

Die Unterschiede in der Menge der gebildeten Plaques bei verschiedenen Substrat- oder Inkubationsbedingungen können quantitativ durch die "efficiency of plating" (EOP) erfaßt werden, die nach Ellis und Delbrück (1939) definiert ist als das Verhältnis der Plaquemenge unter bestimmten Bedingungen verglichen mit der Anzahl Plaques, die unter Standardbedingungen erhalten werden.

Als Standard wurden diejenigen autotrophen Wachstumsbedingungen angesehen, bei denen zu Anfang die Identifizierung der Phagen im Plaquetest ohne Schwierigkeiten gelungen war. Die Plaquebildungsfähigkeit der Phagen unter verschiedenen Substratbedingungen wurde mit Indikatorstämmen geprüft, die sämtlich in NB-Medium mit 0.5 % Fructose angezogen worden waren. In keinem Falle war zu beobachten, daß die Plaquebildung der Phagen auf autotroph gewachsenem Bakterienrasen geringer war als bei irgendeinem heterotrophen Plaquetest. Vielmehr war die EOP heterotroph entweder gleich der EOP auf autotrophen Zellen oder etwas bzw. bei bestimmten Substraten erheblich (um etwa 80 %) geringer. Deshalb wurde der autotrophe Plaquetest trotz längerer Inkubationsdauer bei den meisten der nachfolgenden Experimente beibehalten.

Weil festgestellt worden war, daß die Phagen der Anreicherung 43 lytische Aktivität gegen drei ursprünglich getrennt isolierte Wirtsbakterien (GD, GE und GF) entfalten konnten, wurde die EOP der Phagen gd1, ge und gf auf diesen Indikatorstämmen eingehender untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Phagen gd2 und ge autotroph auf dem Stamm GF genauso gut plattierten wie auf ihrem eigenen Wirtsbakterium, den Stämmen GD bzw. GE. Überraschenderweise ließ sich der Phage gf auf dem Stamm GE autotroph und - etwas geringer - heterotroph mit einer wesentlich besseren EOP vermehren als auf seinem ursprünglichen Indikatorstamm GF.

Adsorptionsversuche wurden ausschließlich zur Vorbereitung der späteren Transduktionsexperimente mit dem Phagen gd2 durchgeführt. Es konnte keinerlei Adsorption des Phagen gd2 an autotroph in Flüssigkeitskultur gewachsenen Zellen des Stammes GD festgestellt werden, wenn 40 Minuten in Mineralmedium mit der Standardgasmischung O_2, CO_2 und H_2 inkubiert wurde. Dagegen waren im heterotrophen Mineralmedium, in dem die Begasung durch 0.1 % Na-Gluconat ersetzt worden war, nach 60 Minuten 50 % der Phagen adsorbiert. Die beste Adsorption wurde in NB-Medium mit Zusätzen von 1 mM Mg^{2+} und 0.1 mM Ca^{2+} bei einer "multiplicity of infection" von 0.23 beobachtet. Nach 5 Minuten waren die Phagen zu 50 % adsorbiert, danach war bei abnehmender Adsorptionsrate nach 30 Minuten eine maximale Adsorption von 80 % erreicht.

Einige Besonderheiten der Phagen gd1 und gf bei ihrer Adsorption an die Zellen der Wirtsbakterien GD und GF sollen ausführlicher im Kapitel über die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Struktur der Phagen beschrieben werden.

2.5. Lysogenisierungsfähigkeit der neuen Phagen

Nach Abschluß der Reinigung der Phagen und der Ausarbeitung geeigneter Methoden zu ihrer Vermehrung wurde die Lysogenisierungsfähigkeit der einzelnen Phagen untersucht. Es wurde also geprüft, ob es mit der Simultanisolierungsmethode gelungen war, temperente Phagen für Wasserstoffbakterien zu finden. Zum experimentellen Nachweis der temperenten Natur eines Phagen dient gewöhnlich sein Verhalten als Prophage in den lysogenen Bakterien:

1. Ein integrierter temperenter Phage macht sein lysogenes Bakterium immun gegen eine Superinfektion durch den homologen Phagen.
2. Flüssigkeitskulturen lysogener Bakterien enthalten stets freie Phagen.
3. Diese spontane Phagenproduktion läßt sich bei den meisten temperenten Phagen durch Induktion künstlich erhöhen.
4. Bei der Titration einwandfreier Lysate von temperenten Phagen können außer den zu erwartenden trüben Plaques auch helle, klare Plaques auftreten. Derartige - "clear-plaque" - Mutanten zeigen, daß der betreffende Phage seine Lysogenisierungsfähigkeit durch spontane Mutation verlieren kann.

2.5.1. Nachweis der lytischen Aktivität lysogener Clone und ihrer Immunität gegen überinfizierende homologe Phagen

Zur Prüfung der temperenten Natur der neuisolierten Bakteriophagen wurden aus den Plaques aller 7 Phagen mindestens 16 lysogene Clone, für die Phagen ga und gb dagegen 32 lysogene Clone isoliert und aus Gründen der Arbeitserleichterung zunächst in deskriptiven Verfahren vorgeprüft.

Bei der Untersuchung der lytischen Aktivität der lysogenen Clone vermochten nur wenige Zellinien aus den Plaques der

Phagen gb und gd2 die Wirtsbakterien in gleicher Weise wie die Phagen selbst zu lysieren. Dagegen waren sämtliche lysogenen Clone aus den Plaques der übrigen Phagen zur lytischen Wirkung gegenüber den entsprechenden Wirtsbakterien befähigt.

Der daneben an allen lysogenen Clonen durchgeführte erste Immunitätstest konnte nicht ausgewertet werden, weil in den Kontrollen häufig keine Lysis der sensiblen Wirtsbakterien eintrat. Auch der zweite Tropftest zur Prüfung der Immunität war insofern noch unbefriedigend, als nicht in allen Fällen eindeutig festgestellt werden konnte, inwieweit sich aus den aufgetropften Phagenlysaten lytische Aktivität innerhalb des Bakterienrasens entwickelt hatte.

Während des ausgedehnten Prüfungsverfahrens waren von einem Großteil der lysogenen Clone die NB-Stammkulturen nach zwei Monaten Aufbewahrung im Kühlschrank eingegangen, so daß für die abschließenden quantitativen Untersuchungen zum endgültigen Nachweis der Lysogenie nur noch einige Clone zur Verfügung standen. Für den Phagen ga wurden 16 lysogene Clone neu isoliert und für alle 16 die Fähigkeit zur spontanen Phagenproduktion nachgewiesen.

Gegenüber den deskriptiven Voruntersuchungen ermöglichte die quantitative Überprüfung der Immunität der lysogenen Clone eine eindeutigere Interpretation der Ergebnisse. Die lysogenen Clone von 5 Phagen (GA(ga)11 bis GA(ga)116, GC(gc)111, GC(gc)114, GD(gd2)111, GD(gd2)114, GE(ge)15, GE(ge)18, GF(gf) 18 und GF(gf)19) erwiesen sich als "immun" gegen steigende Konzentrationen von überinfizierenden homologen Phagen. Der lysogene Clon GD(gd1)14 wurde nicht gegenüber der Überinfektion des eigenen Phagen gd1 geprüft, erwies sich aber als immun gegen die Phagen gd2, ge und gf. Der lysogene Clon GB(gb) 116 war nicht immun, wohl aber war auf ihm der Titer des Phagen gb um 85 % gegenüber einer Bestimmung auf dem normalen Indikatorstamm GB reduziert. Eine Prüfung weiterer 16 neuiso-

lierter lysogener Clone auf Immunität und auf lytische Aktivität führte ebenfalls nicht zum Nachweis der temperenten Natur des Phagen gb.

2.5.2. Induzierbarkeit lysogener Stämme

Mit den lysogenen Clonen, deren Immunität und plaquebildende Wirkung erwiesen war, wurden Induktionsversuche mit Mitomycin-C durchgeführt. Beim autotrophen Plattentest mit Antibiotica-Plättchen konnte die Induzierbarkeit der lysogenen Clone von sechs Phagen festgestellt werden. Nur bei den Zellinien, die aus den Plaques des Phagen gb abgeimpft worden waren, zeigte sich außer einer schwachen antibiotischen Wirkung des Mitomycin-C kein Effekt. Ebenso fehlte hier die Aufhellung des Bakterienrasens, wie sie sonst durch spontane Phagenproduktion der beigemischten lysogenen Zellen beobachtet wurde. Bei einem Gemisch der lysogenen Stämme und der Indikatorbakterien im Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 5 gab sich die Induzierbarkeit der jeweiligen Prophagen durch eine 2 bis 4 cm breite Lysiszone um das aufgelegte Mitomycin-C-Plättchen zu erkennen. Diese Lysiszone erschien nicht auf den Kontrollplatten ohne Mitomycin-C. Bei einem Mischungsverhältnis von $1 : 10^3$ bis $1 : 10^4$ wurde eine größere Häufigkeit von Einzelplaques innerhalb einer breiten Diffusionszone um das Mitomycin-C-Plättchen geobachtet. Auf den Kontrollplatten ohne Mitomycin-C waren die Plaques mit normaler statistischer Streuung über den ganzen Bakterienrasen verteilt.

Versuche in Flüssigkeitskultur zum Nachweis der Induzierbarkeit wurden erfolgreich mit zwei lysogenen Stämmen durchgeführt, die aus Plaques des Phagen gc isoliert worden waren. Es wurde die für induzierbare lysogene Systeme zu erwartende Trübungsabnahme festgestellt. Eine Titration der Kulturflüssigkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten ergab, daß die Rate

der Phagenproduktion der lysogenen Kulturen durch die Mitomycin-C-Induktion um einen Faktor von 10^3 gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht war (Abbildung 7).

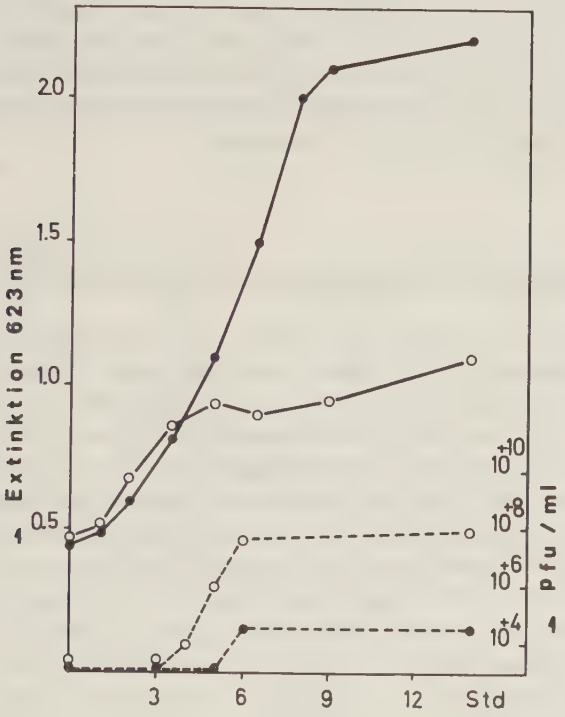


Abb. 7: Mitomycin-C-Induktion des lysogenen Stammes GC(gc)114

Eine ÜNK von GC(gc)114 wurde 1 : 100 verdünnt in zwei Reagenzglas-NB-Kulturen, beide nach 3 Stunden Inkubation bei 30° C gewaschen und resuspendiert. 1 µg Mitomycin pro ml wurde zu einer Kultur zugegeben und Trübungsverlauf und Phagenproduktion gemessen.

●——● Trübungsverlauf GC(gc)114 unbehandelt

○——○ Trübungsverlauf GC(gc)114 mit 1 µg Mitomycin/ml versetzt

●- -● spontane Phagenproduktion

○- -○ Phagenproduktion durch Mitomycin-C-Induktion

2.5.3. Spontane "clear-plaque"-Mutanten als zusätzlicher Hinweis auf die temperente Natur der Phagen

Aus nicht verunreinigten Lysaten der Phagen gc und gf konnten kleine klare Plaques (Durchmesser 0.5 mm für gc und 1 bis 2 mm für gf) neben den normalen trüben Plaques angetroffen werden. Der Titer dieser kleineren Plaques wurde aus größeren Verdünnungen auf 10^{+3}/ml geschätzt. Das Vorhandensein dieser Plaquemutanten wurde als zusätzlicher Nachweis für die temperente Natur der Phagen gc und gf angesehen.

2.6. Bestimmung der spezifischen Dichte ϱ der Phagen

Die spezifische Dichte der Phagen wurde durch Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Gradienten bestimmt. Für den Phagen gc, der offensichtlich im Gleichgewichtslauf durch CsCl abgetötet wurde, konnten keine Werte für die spezifische Dichte erhalten werden. Als Referenzphagen wurden die Salmonellaphagen P22 und L mit der angegebenen Dichte von 1.505 g/cm^3 (Schmieger, 1968; Bezdek und Amati, 1967) benutzt. Die Ergebnisse der CsCl-Gleichgewichtszentrifugationen sind in der Tabelle 4 für alle Phagenlysate dargestellt. Bei der für den Phagen gd2 angegebenen spezifischen Dichte handelt es sich um einen Korrekturwert, der mit Hilfe des Referenzphagen P22 ermittelt wurde.

Tab. 4: Spezifische Dichte der neuisolierten Phagen

Phage	ga	gb	gd1	gd2	ge	gf
ϱ 1	1.475	1.486	1.475	1.476	1.474	1.476
ϱ 2	-	-	-	-	1.474	1.476

Die Doppelbestimmungen für die Phagen ge und gf ergaben identische Werte. Wegen dieser Genauigkeit der Gleichgewichtszentrifugation wurde auf weitere Mehrfachbestimmungen verzichtet. Die Abbildung 8 zeigt eine Auftragung des Phagentiters der einzelnen Fraktionen eines CsCl-Gleichgewichtslaufs über der abfallenden Linie des Gradienten. Eine derartige Auftragung ermöglicht die graphische Ermittlung der spezifischen Dichte der zentrifugierten Phagen, indem vom jeweils höchsten Titer eines Phagenlysats das Lot auf die Abszisse gefällt und der Schnittpunkt mit der abfallenden Linie des CsCl-Gradienten bestimmt wird.

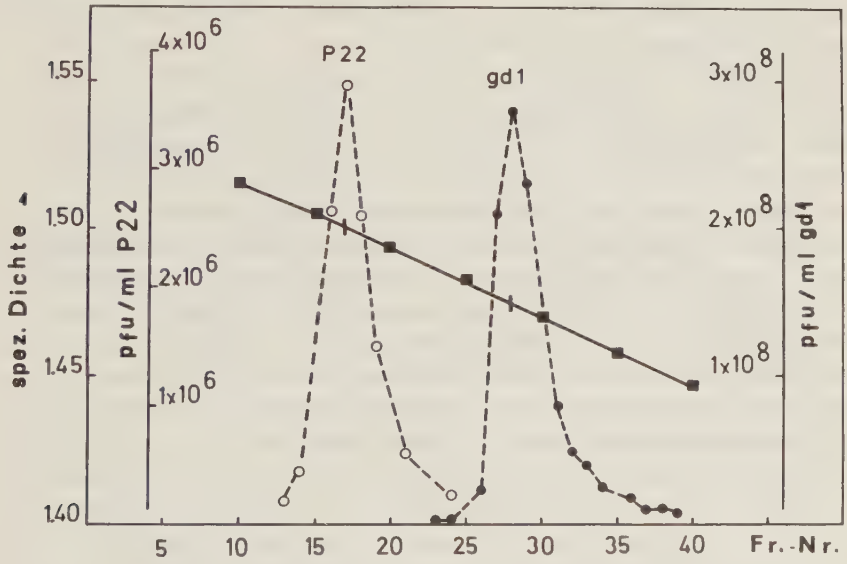


Abb. 8: CsCl-Gleichgewichtszentrifugation des Phagen gd1. Die Fraktionen wurden mit einer Hohlnadel dem Boden des Zentrifugenröhrchens entnommen. Die Bestimmung der spezifischen Dichte erfolgte refraktometrisch.

■——■ refraktometrisch ermittelter Dichteverlauf im Gradienten

●- - -● Titer des Phagen gd1

○- - -○ Titer des Referenzphagen P22

2.7. Nachweis enger Verwandtschaft der vier Phagen aus der Anreicherung 43 durch Experimente zur kreuzweisen Immunität

Schon während der vorangegangenen Charakterisierungsexperimente waren einige zusätzliche Arbeiten mit den Phagen der Anreicherung 43 durchgeführt worden, weil gleich nach ihrer Isolation der Verdacht aufgekommen war, daß eventuell viermal die gleichen Phagen entdeckt worden waren. Sämtliche lysogenen Clone der Phagen gd1, gd2, ge und gf, die schon vorher auf Plaque-bildende Wirkung, Immunität und Induzierbarkeit geprüft worden waren, wurden für eine quantitative Titration der Lysate benutzt. Es wurde bei allen ausplattierten Verdünnungen der Phagen gd2, ge und gf auf keinem autotroph oder heterotroph gewachsenen Bakterienrasen der lysogenen Clone ein Plaque gesehen und auch bei höheren Konzentrationen keinerlei Lysis beobachtet. Dagegen wurden auf den parallel benutzten drei Indikatorstämmen unter beiderlei Inkubationsbedingungen (heterotroph/autotroph) Plaques mit unterschiedlicher EOP festgestellt, je nachdem auf welchem der drei gegen alle Phagen sensiblen Indikatorstämme die Lysate titriert worden waren. Die gemeinsame Immunität der lysogenen Clone der vier Phagen gd1, gd2, ge und gf gegen die Phagenlysate gd2, ge und gf stellt einen starken Hinweis auf die enge Verwandtschaft der Phagen aus der Anreicherung 43 dar und erhärtet den ursprünglichen Verdacht.

2.8. Versuch einer Transduktion der Rifampicinresistenz durch den Phagen gd2

Der Nachweis von transduzierenden Aktivitäten sollte durch Übertragung von Resistenzmerkmalen versucht werden. Bei der Selektion spontaner Streptomycin- und Rifampicin-Resistenzmutanten der Indikatorbakterien GB und GD wurde mit 5×10^{-9}

bis 1×10^{-10} eine sehr niedrige spontane Mutationsrate für Streptomycin beobachtet, während die spontane Mutationsrate der Rifampicinresistenz, die für den Stamm GD bestimmt wurde, mit 1×10^{-8} höher lag. Transduktionsversuche wurden nur mit dem Phagen gd2 durchgeführt. Dabei wurden Lysate benutzt, die einmal auf Rifampicin-resistenten Mutanten des Stammes GD vermehrt worden waren. Geeignete Adsorptionsbedingungen waren schon vorher ausgearbeitet und sind im Kapitel 2.4. "Efficiency of plating" und Adsorption der Phagen beschrieben worden. Es konnte bisher kein Effekt beobachtet werden, der eine Übertragung der Resistenzmerkmale auf den Wildtyp GD durch den Phagen gd2 eindeutig bewiesen hätte.

2.9. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktur der Phagen

Unter den sieben neuisolierten Bakteriophagen waren einige im Elektronenmikroskop (EM) einander sehr ähnlich. Alle Phagen besaßen einen Kopf und einen deutlich ausgebildeten Schwanz. Weil sie in Gestalt und Größe ihrer Köpfe nahezu gleich waren, wurden die Phagen entsprechend dem Aufbau ihrer Schwänze in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bildeten die Phagen ga und gb, die zweite Gruppe die übrigen fünf Phagen: gc, gd1, gd2, ge und gf. Die Angaben zur Größe der Phagen bzw. einzelner Strukturen der Phagenpartikeln sind in den Tabellen 5 und 6 (Seite 70 und 77) zusammengestellt, wobei die Dimensionen in nm-Einheiten angegeben sind.

2.9.1. Beobachtungen an den Phagen der Gruppe I

Die beiden Phagen der ersten Gruppe erschienen nach Negativkontrastierung von ihrer Struktur her gleich (siehe Abbildung 9 und 10, Seite 67 und 69) und unterscheiden sich auch in ihren Dimensionen nur geringfügig (Tabelle 5, Seite 70). Deshalb sollen die Ergebnisse ihrer elektronenmikroskopischen Beobachtungen zusammen besprochen werden.

Bei beiden Phagen zeigen die Abbildungen von intakten Köpfen eine sehr regelmäßige Form (Abbildung 9a und 10a), die als Projektion des Phagenkopfes in die Ebene hexagonal erscheint. Der Durchmesser der Köpfe beträgt 540 bis 590 Å. Die regelmäßige hexagonale Form der Phagenköpfe geht jedoch nach dem Verlust ihres Inhalts, der Nukleinsäure, sehr leicht verloren. Das zeigen die leeren, unregelmäßig verformten Phagenköpfe der Abbildungen 9b, 9c und 9d: an die Stelle der ausgetretenen Nukleinsäuren ist dort dunkel erscheinendes Kontrastierungsmaterial in die leeren Phagenköpfe eingedrungen. Bei diesen leeren Phagenköpfen ist aber häufig die Ansatzstelle des Phagenschwanzes besser zu erkennen (siehe Abbildung 9c) als bei intakten Köpfen, die meistens durch zuviel eingetrocknete Kontrastierungslösung in der interessierenden Region schlecht durchstrahlbar sind (Abbildung 9a und 10a).

Die intakten Schwänze der Phagen ga und gb haben annähernd die doppelte Länge des Kopfdurchmessers. Sie erscheinen auf den Abbildungen 9a, 9b, 9c, 9e und 10a als schmale Zylinder, die sich kurz vor der Berührung mit dem Phagenkopf konisch verjüngen. Diese Verjüngung ist auf Photographien von Phagen mit leeren Köpfen (Abbildung 9b, 9c) besser zu erkennen als bei intakten Phagen (Abbildung 9a, 10a). Die intakten Phagenschwänze haben im ausgetreckten Zustand eine deutlich sichtbare Oberflächenstruktur, die aus schräg verlaufenden, sich abwechselnden hellen und dunklen Banden (Abbildung 9a, 9b, 9c, 9e und 10a) besteht. Der Abstand dieser schräglaufenden Li-

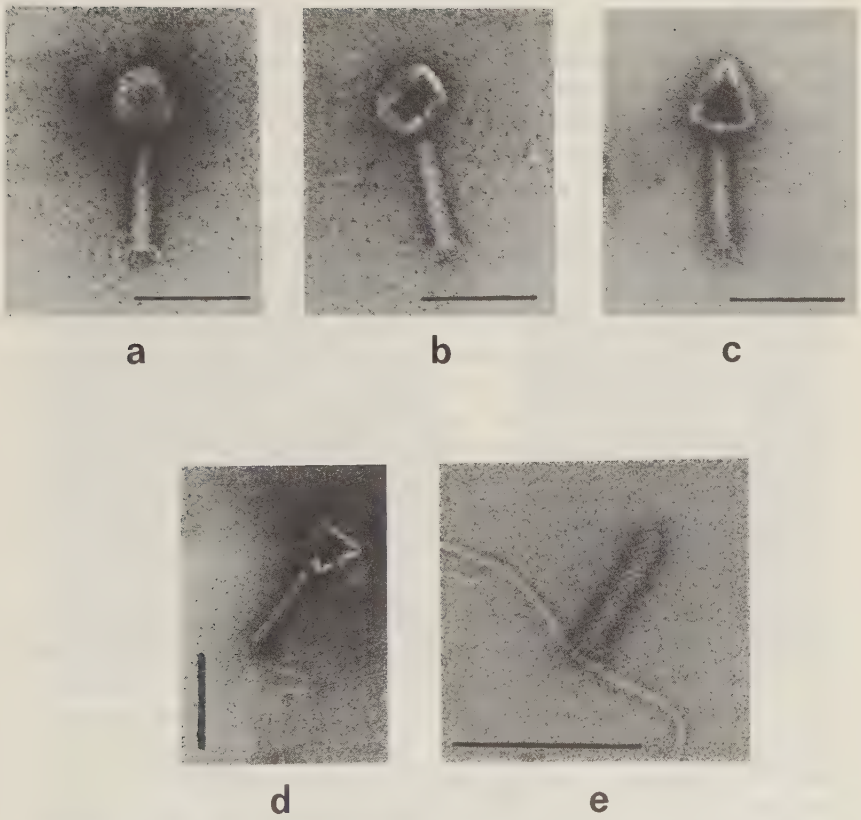


Abb. 9: Phage gb
(a) intakter Phage, Uranylac., x 225000, Maßstab = 1000 Å
(b, c) Phagenpartikel mit leerem Kopf, Uranylac., x 225000, Maßstab = 1000 Å
(d) desintegrierter Phage mit leerem Kopf und ohne Schwanzscheide, Uranylac., x 180000, Maßstab = 1000 Å
(e) abgebrochener Phagenschwanz im unkontrahierten Zustand, zufällig mit Endplatte an Fimbria angelagert, Uranylac., x 360000, Maßstab = 1000 Å

nien (Periodizität) und der Winkel, den sie mit der Längsachse des Phagenschwanzes bilden, konnte bestimmt werden. Außerdem weisen die intakten Phagenschwänze an dem Ende, das dem Phagenkopf gegenüberliegt, eine besondere Struktur auf, aus der dünne Fibern herausragen. Manchmal erscheinen diese Fibern an ihren Enden kugelig verdickt (Abbildung 9a, 9b, 9c und 9e). Die Abbildung 9e zeigt einen abgebrochenen ausgestreckten Schwanz des Phagen gb ohne Kopf, bei dem die Endstruktur gut zu sehen ist, weil infolge einer wohl zufälligen Anlagerung des Phagenschwanzes an eine Bakterienfimbria Kontrastierungslösung in einer für eine detaillierte Darstellung geeigneten Menge und Verteilung eingetrocknet war. Man erkennt deutlich, daß der Phagenschwanz mit einer Endplatte abschließt, die sich in der Form eines sehr flachen Kegels etwas über seine eigentliche Breite hinausdehnt. Weiter können sechs kurze Fibern gezählt werden, die ihre Ansatzstellen am äußeren Rand der Endplatte haben.

Die Schwänze der Phagen ga und gb sind kompliziert gebaut und weisen zusätzlich zur Endplatte weitere Strukturen auf (siehe Abbildung 9d und 10b). Die Abbildung 9d zeigt einen teilweise desintegrierten Phagen gb, der nicht nur den Inhalt seines Kopfes, sondern auch die äußere Schwanzhülle (Scheide) mitsamt der Endplatte verloren hat. Vom Phagenschwanz ist nur noch eine dünne lange Röhre übriggeblieben, in deren inneren Hohlraum Kontrastierungslösung eingedrungen ist. Man erkennt eine fadenförmige Struktur, wahrscheinlich ein Nukleinsäuremolekül, das aus dem offenen Ende der Röhre herausragt. Auch der Schwanz des Phagen ga besitzt eine solche Röhre in seinem Innern. Sie kann außer durch Verlust der äußeren Schwanzscheide auch durch Kontraktion hervortreten. Die Abbildung 10b zeigt einen Phagenschwanz, dessen Scheide auf etwa die Hälfte seiner ursprünglichen Länge kontrahiert ist, wobei sie deutlich breiter geworden ist. Die Oberflächenstruktur der Scheide erscheint gegenüber dem unkontrahierten Zustand ebenfalls verändert, konnte aber noch nicht genauer analysiert

werden. Aus der Abbildung ist ferner zu ersehen, daß die Endplatte nach der Schwanzkontraktion etwa den gleichen Durchmesser wie die breiter gewordene äußere Hülle hat. Die Fibern sind im einzelnen nicht erkennbar, könnten sich jedoch um die vorgestoßene innere Röhre gelegt haben.

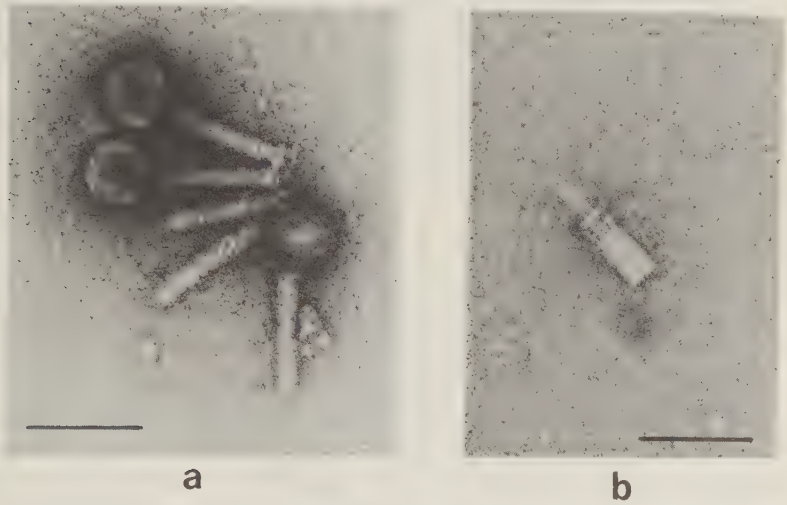


Abb. 10: (a) Intakte Partikeln und abgebrochene, unkontrahierte Schwänze des Phagen ga, Uranylac., x 225000, Maßstab 1000 Å.

(b) Kontrahierte Scheide des Phagen ga mit Endplatte und innerer Röhre, Uranylac., x 225000, Maßstab 1000 Å.

Tab. 5: Dimensionen der Phagen mit kontrahierbarem Schwanz (in nm)

Phage	Kopf			Schwanz im ausgestreckten Zustand							
				äußere Hülle (Scheide)			Endplatte		Fibern		
	Durchm.	Diagonale	Seitenfl.	Länge	Breite	Periodiz.	Breite	Dicke	Länge		
ga	54 - 56	58 - 62	28 - 33	98 - 107	19 - 20	5.5 - 6.0	21 - 22	1.8 - 2.1	11 - 12		
gb	55 - 59	59 - 61	29 - 31	98 - 102	18 - 20	5.5 - 7.0	18 - 20	1.5 - 2	7 - 11		
				Schwanz im kontrahierten Zustand							
				äußere Hülle (Scheide			innere Röhre				
				Länge	Breite	inn.Durchm.	Länge	inn.Durchm.	äuß.Durchm.		
ga				43 - 50	24 - 26	7 - 10	98 - 104	1.8 - 2.0	9 - 11		
gb							99 - 111	2.0 - 2.3	9 - 10		

2.9.2. Beobachtungen an den Phagen der Gruppe II

Die Längenmessungen (siehe Tabelle 6, Seite 77) der fünf morphologisch gleichen Phagen gc, gd1, gd2, ge und gf ergaben keine gravierenden Unterschiede, die eine weitergehende Differenzierung ermöglicht hätten. Wie bei den Phagen der ersten Gruppe hatten auch die Projektionen der Köpfe der fünf Phagen aus der zweiten Gruppe im intakten Zustand eine regelmäßige hexagonale Form (Abbildung 11a)mit einem Durchmesser von 530 bis 570 Å. Der Durchmesser und die übrigen Dimensionen der Köpfe von den fünf Phagen aus der zweiten Gruppe befinden sich im gleichen Größenbereich, der auch für die Abmessungen von Phagenköpfen der ersten Gruppe festgestellt wurde (siehe Tabelle 5 und 6, Seite 70 und 77).

Diese Gemeinsamkeiten bei beiden Phagentypen gelten nicht für den Aufbau der Phagenschwänze: Die Schwänze der Phagen gc, gd1, gd2, ge und gf sind fast dreimal so lang wie der Durchmesser der Phagenköpfe. Sie erscheinen in elektronenmikroskopischen Abbildungen nach Negativkontrastierung als dünne, gebogene Strukturen (Abbildung 11, 12 und 14, Seite 72, 74 und 76), die nur etwa 100 Å breit sind. Die Biegungen der Schwänze sind unterschiedlich von Abbildung zu Abbildung. Die Schwänze besitzen eine Oberflächenstruktur mit einer typischen Querstreifung, die von parallelen Linien gebildet wird. Dabei wechseln sich helle und dunkle Banden ab. Das Muster der Querstreifung ist am besten in der Abbildung 14b zu erkennen. Diese Oberflächenstruktur der Schwänze der fünf Phagen aus der Gruppe II unterscheidet sich deutlich von derjenigen, die bei unkontrahierten Schwänzen von Phagen der Gruppe I festgestellt worden ist (siehe Abbildung 9a, 9b, 9c, 9e und 10a). Aber in beiden Phagentypen beweist die Entstehung eines deutlich strukturierten Musters für die Oberfläche des Schwanzes nur, daß die Phagenschwänze keine glatte Oberfläche haben können, weshalb beim "negative staining"-Prozeß Kontrastierungslösung eindringen kann.

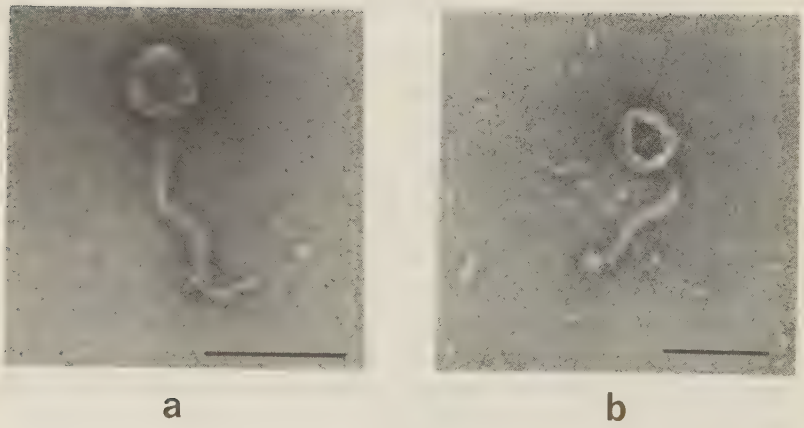


Abb. 11: Phagen mit langem, nichtkontrahierbarem Schwanz
(a) Phage gf mit intaktem Kopf, Uranylac., x 260000, Maßstab = 1000 Å;
(b) Phage gd2 mit leerem Kopf, Uranylac., x 200000, Maßstab = 1000 Å.

Bei allen fünf Phagen der Gruppe II setzt sich der Schwanz über sein Ende hinaus mit einem Appendix fort (Abbildung 11, 12 und 14). Dieser ist nur geringfügig dünner als der Schwanz selber und zeigt eine auffallende Flexibilität. Ausgestreckt erreicht der Appendix etwa ein Drittel der Länge des Schwanzes. Er scheint in diesem Zustand eine Querstruktur zu besitzen, die noch nicht eindeutig analysiert werden konnte (Abbildung 11a, 14b). Er kann aber auch zusammengerollt sein, hat dann in Projektion die Form eines Kreises mit einem Durchmesser von 190 bis 200 Å (Abbildung 11b, 14a).

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Lysate gd1

und gf wurden mitunter Phagen beobachtet, deren Schwänze mit dem Appendix an Fimbrien adsorbiert waren. Die Annahme einer spezifischen Adsorption von Partikeln der Phagen gd1 und gf an Bakterienfimbrien wurde durch elektronenmikroskopische Kontrolle von Adsorptionsversuchen mit den betreffenden Wirtsbakterien GD und GF bestätigt. Auf NB-Platten gewachsene Bakterien, die in Phagenlysaten suspendiert und für eine Stunde bei 30° C in Kontakt mit den Phagen gelassen wurden, besaßen nach Waschen und Resuspendieren in frischem Puffer Phagen, die entweder an Fimbrien (Abbildung 12) oder an den Polkappen (Abbildung 13) adsorbiert waren. Dabei wurden die Phagenköpfe in der Regel erst entleert vorgefunden, wenn die Phagen an den Polkappen des infizierten Bakteriums adsorbiert waren (siehe Abbildung 12 und 13).

Eine Besonderheit, die zur Zeit noch nicht erklärt werden kann, wurde bei genauerer Untersuchung von Lysaten der Phagen gd1 und ge festgestellt. In selteneren Fällen wurden Phagen mit leeren Köpfen beobachtet, deren Schwänze länger als normal erschienen (Tabelle 6, Seite 77). Messungen ergaben eine doppelte Länge gegenüber dem normalen Phagenschwanz bzw. eine annähernd doppelte Länge. In Abbildung 14a und 14b sind leere Phagen mit normalem bzw. überlangem Schwanz gegenübergestellt.

Abb. 12: Spezifische Adsorption der gf-Phagen an Fimbria.
(a) Uranylac., x 204000, Maßstab = 1000 Å;
(b) Uranylac., x 247000, Maßstab = 1000 Å.
Dem Lysat des Phagen gf waren Zellen von NB-Platten für 1 Std. bei 30° C zugesetzt worden. Mikrophotographien von adsorbierten Phagen wurden nach Waschen und Resuspendieren in frischem Puffer aufgenommen.

Abb. 13: Adsorption der gf-Phagen an die Polkappen des Wirtsbakteriums GF.
Uranylac., x 270000, Maßstab = 1000 nm.
Dem Lysat des Phagen gf waren Zellen von NB-Platten für 1 Std. bei 30° C zugesetzt worden. Mikrophotographien von adsorbierten Phagen wurden nach Waschen und Resuspendieren in frischem Puffer aufgenommen.

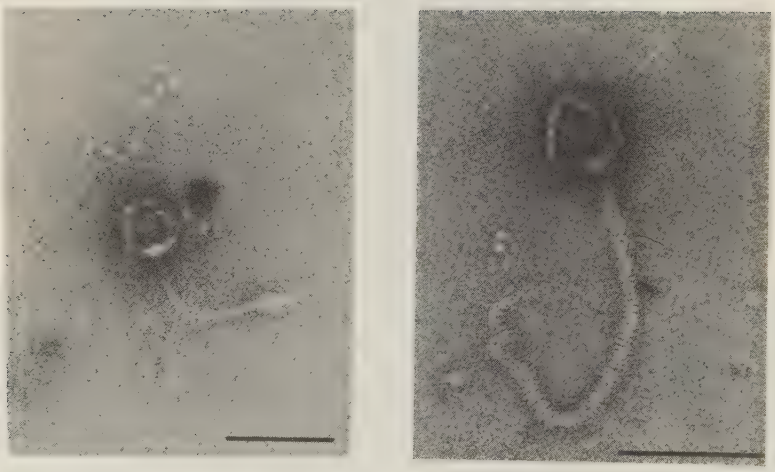


Abb. 14: Partikeln des Phagen ge mit unterschiedlich langen Schwänzen.
(a) Uranylac., x 204000, Maßstab = 1000 Å, Phagenpartikel mit normaler Schwanzlänge.
(b) Uranylac., x 270000, Maßstab = 1000 Å, Phagenpartikel mit überlangem Schwanz.

Tab. 6: Dimensionen der Phagen mit flexiblem Schwanz (in nm)

Phage	K o p f			S c h w a n z						
				Länge			Breite	Ø inn. Hohl-raum	Appendix	
	Durchm.	Diagonale	Seitenfl.	gesamt	normal	überlang			Øeingerollt	Länge
gc	53 - 56	59 - 62	30 - 32		147-153	-	9-12	2.0-2.5	19 - 20	
gd1	54 - 57	57 - 60	30 - 32		138-142	275	8-9	1.8-2.2	16 - 20	42 - 46
gd2	54 - 56	60 - 62	30 - 33		142-148	-	11-13		18 - 20	
ge	53 - 56	57 - 61	26 - 29	170-191	135-142	270-282	10-13	1.8-2.0	19 - 21	44 - 55
gf	53 - 56	57 - 59	26 - 29		129-142	-	11-13	1.8-2.0	20 - 22	43 - 46

3. Charakterisierung der neuen Wirtsbakterien

Die Simultanisolierungsmethode hatte einerseits zur Entdekkung intakter "Knallgas"-Phagen und andererseits zur Isolierung geeigneter Wirtsbakterien für die neuen Bakteriophagen geführt. Zur Identifizierung dieser Wirtsbakterien war eine große Zahl neuer Stämme von Wasserstoffbakterien aus den Anreicherungen isoliert worden. Bei denjenigen Neuisolaten, die sich nach dem Auftropfen der Phagenlysate als sensible Indikatorstämme erwiesen hatten, wurden im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Parameter ihrer Physiologie und Morphologie etwas genauer untersucht. Zunächst wurde mit einigen Experimenten sichergestellt, daß die neuen Wirtsbakterien aktiv Wasserstoff oxidieren können. Weitere Versuche zur Charakterisierung wurden durchgeführt, um eine vorläufige Einordnung der Wirtsbakterien in die Systematik der Wasserstoffbakterien, die von Davis et al. (1969, 1970) neu geordnet wurde, zu ermöglichen.

Außerdem wurden in der Abteilung für Bakterienphysiologie des hiesigen Instituts für Mikrobiologie weitere Untersuchungen an den neuisolierten Reinkulturen durchgeführt.

3.1. Untersuchungen zum Wachstum der Wirtsbakterien unter autotrophen Bedingungen

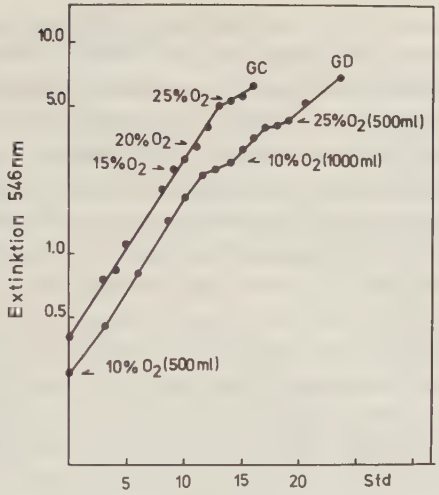
Zwar waren alle sechs Wirtsbakterien als Einzelkolonien von autotroph inkubierten Mineralmediumplatten isoliert worden; es war jedoch noch nicht sicher, ob die neuen Stämme unter autotrophen Standortbedingungen in Flüssigkeitskultur wachsen würden oder ob für ein befriedigendes Wachstum das Mineralmedium supplementiert bzw. modifiziert werden mußte. Das autotrophe Wachstum wurde in Schüttelkulturen und Fermenteranzuchten geprüft.

10 ml-Mineralmedium-Kulturen, die in 100 ml-Erlenmeyerkölbchen im Witt'schen Topf mit 10 % O_2, 10 % CO_2 und 80 % H_2 begast worden waren, erreichten nach 7 Tagen Inkubation bei 30° C (Rüttelmaschine, Stellung II) eine Trübung von 0.25 bis 0.35. Wurden aus diesen Vorkulturen 5 ml in 250 ml Mineralmedium in 1 l- Erlenmeyerkolben mit Schikanen und Begasungsaufsätzen überimpft und autotroph in der gleichen Gasatmosphäre inkubiert, so stieg die Trübung dieser Kulturen im Laufe von 3 bis 4 Tagen (auf der Schüttelmaschine bei 30° C) auf eine optische Dichte (546 nm) von 1.5 bis 2.5. Der pH-Wert der Kulturen blieb bis zu einer OD von 1.0 konstant, um bei zunehmendem Wachstum bis auf 6.5 abzusinken. Die Farbe der Flüssigkeitskulturen war zu Beginn grünlich und veränderte sich mit höherer Zelldichte zu einem gelben Farbton, der noch einen Grünstich aufwies. Eine deutlich rötlich bis orange Färbung wurde bei den Stämmen GB und GD nur einmal beobachtet, als versehentlich durch Undichtigkeit der Begasungseinrichtung alle angezogenen Kulturen nicht mit dem Standard-Gasgemisch versorgt werden konnten. Damit war für die neuisolierten Wirtsbakterien gezeigt worden, daß sie in kleinen Flüssigkeitskulturen autotroph nicht schlechter wuchsen als die bekannten Alcaligenes-Laborstämme.

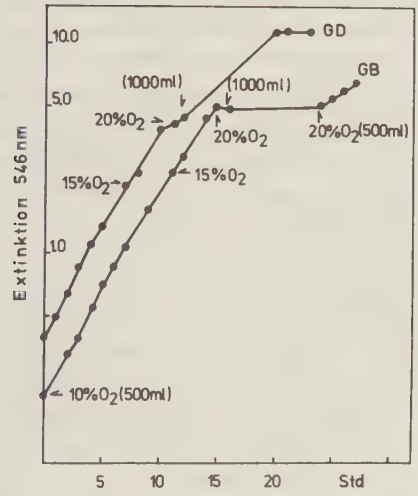
Das gute Wachstum in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei Inkubationsbedingungen also, die eine befriedigende O_2-Übergangsrate gewährleisten, deutete bereits darauf hin, daß die neuen Stämme von Wasserstoffbakterien in leistungsfähigen Fermentersystemen angezogen werden konnten. Bei den Untersuchungen zur Massenanzucht unter Standardbedingungen der autotrophen Kultur im 10 l- Braun-Biostat-Fermenter zeigte sich jedoch, abhängig vom eingeimpften Stamm, ein Abknicken des exponentiellen Wachstums schon bei einer $OD_{546\,nm}$ von 1.8 bis 2.8. Die Verdopplungszeit schwankte für die einzelnen Stämme zwischen 2 Stunden 45 Minuten und 3 Stunden 20 Minuten und lag damit in der Größenordnung der meisten Alcaligenes-Laborstämme. Bei einer halblogarithmischen Auftragung wurde festgestellt, daß

sämtliche Wachstumskurven am Ende der exponentiellen Phase langsam abbiegen und erst allmählich in die stationäre Phase übergehen. Nachträgliche Erhöhungen des O_2-Anteils im Gasgemisch oder die Verdopplung der Begasungsrate ermöglichten den Bakterien zwar eine Verbesserung des Wachstums, aber die ursprüngliche Wachstumsrate wurde durch derartige Manipulationen nicht wieder erreicht (siehe Abbildung 15a, Stamm GD). Durch eine rechtzeitige stufenweise Umstellung des O_2 Partialdruckes auf höhere Werte ließ sich das exponentielle Wachstum der Bakterien mühelos bis zu einer $OD_{546\,nm}$ von 5.0 verlängern (Abbildung 15a, Stamm GC). Jedoch reagierten nicht alle Stämme in gleicher Weise auf eine solche variierte Begasung. So zeigte sich beispielsweise beim Stamm GB eine Wachstumshemmung, wenn die Erhöhung des O_2-Anteils bzw. die Verdopplung der Begasungsrate zu früh vor dem Ende der Phase des logarithmischen Wachstums vorgenommen wurde. Diese Wachstumshemmung ließ sich durch Zurückstellen der Begasungsrate auf den alten Wert zu einem späteren Zeitpunkt beseitigen. Die gleiche Manipulation bei der Gasversorgung - vorgenommen jedoch erst nach deutlichem Abknicken der Wachstumskurve - führte bei dem Stamm GD zu keiner Hemmung, sondern bewirkte sogar eine Steigerung des Wachstums (Abbildung 15b). Die CO_2- und H_2-Anteile des Gasgemisches wurden nicht variiert, da diese Komponenten das Wachstum bei autotrophen Massenanzuchten anderer H_2-Bakterien selbst bei höheren Zelldichten nicht begrenzen.

Eine Wachstumshemmung durch zu hohe H^+-Ionen-Konzentration sollte durch periodische pH-Korrektur mit 10 N NaOH ausgeschlossen werden und konnte auch zu den Zeitpunkten der Korrektur nicht festgestellt werden. Die Analyse der NH_4^+-Konzentrationen im Kulturmedium ergab, daß eine Wachstumshemmung durch N-Mangel von einer $OD_{546\,nm}$ von 9.0 ab nur beobachtet werden konnte, wenn kein $(NH_4)_2SO_4$ zu der anfänglichen 0.2%-igen $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration nachgefüttert wurde. Zusätzlich wurde eine PHB-Bestimmung nach der Infrat-spektrometrischen



15 a



15b

Abb. 15 a und b: Wachstum der neuisolierten Wirtsbakterien im 10 l - Braun - Biostat - Fermenter unter autotrophen Bedingungen. Gasatmosphäre zum Zeitpunkt der Animpfung: 500 ml/min, 10 % O_2, 10 % CO_2 und 80 % H_2

Methode (Jüttner, 1973) durchgeführt. Proben aus Kulturen mit N-Überschuß wiesen nur geringe oder keine meßbaren PHB-Gehalte auf. Eine Anhäufung von PHB, insbesondere bei N-Mangel ist für viele Bakterien, so auch Wasserstoffbakterien, beschrieben worden (Schlegel et al., 1961b). Daß auch die neuisolierten Wasserstoffbakterien PHB in größeren Mengen akkumulieren können, wurde an heterotrophen Schüttelkulturen nachgewiesen, die nach Beendigung ihres Wachstums gewaschen und mit Mineralmedium ohne N-Quelle 24 Stunden nachinkubiert worden waren.

Die Trübungsmessung war manchmal, insbesondere bei den hohen Zelldichten der Fermenterkulturen, nicht ganz unproblematisch, weil die Zellen nach dem Verdünnungsschritt sofort ausflockten und Zellaggregate verschiedener Partikelgröße bildeten. Diese Tendenz der Zellaggregatbildung war schon vorher bei NB-Reagenzglas-Kulturen, die auf einem Rollbebrüter mit langsamer Drehung inkubiert worden waren, als vorübergehende Zwischenphase im Wachstum beobachtet worden. Beim Stamm GF wurde selbst unter den intensiven Umwälzbedingungen im Fermenter (600 Umdrehungen des Blattrührers pro Minute) Wandwachstum der Zellen festgestellt, das allerdings sehr gering war. Unter den gewählten Bedingungen wurden als höchste Trübung Werte von 10 bis 12 ($OD_{546\ nm}$) gemessen. Bei geeigneter stufenweiser Umstellung der Begasungsraten wurde mit allen Stämmen in 25 bis 30 Stunden ein Anstieg der Trübung von 0.2 auf 12 erreicht. Parallel durchgeführte Trockengewichtsbestimmungen ergaben einen Zellertrag von 3.5 bis 4.5 g/l. Unter den gewählten Bedingungen blieb dabei der PHB-Gehalt der Zellen sogar bei Ernte der Kulturen unter 5 %, bezogen auf mgTg/ml. Bei allen Fermenterkulturen ergaben Proteinbestimmungen nach der Biuret-Methode einen Proteingehalt der autotroph gezogenen Zellen von 70 bis höchstens 85 %, bezogen auf mgTg/ml - sofern noch ein N-Überschuß von mindestens 0.1 µg NH_4^+/ml im Kulturmedium festgestellt werden konnte.

3.2. Verwertung von Substraten

Bei der Prüfung auf Substratverwertung auf Agarplatten wuchsen alle sechs Stämme gut auf den angebotenen Zuckern D(+)-Glucose, D(-)-Fruktose, D(+)-Xylose, L(+)-Arabinose, Saccharose, Maltose und Cellobiose. Nur D(+)-Galaktose wurde unterschiedlich verwertet: Kein bzw. minimales Wachstum zeigten die Stämme GD, GE und GF, gutes Wachstum die Stämme GA, GB und GC. Gleichmäßig gutes Wachstum wurde ferner auf folgenden Substraten beobachtet: Gluconat, meso-Inositol, D(+)-Mannitol, Glycerin, Glutamat, Succinat, D-Malat, L-Leucin, Isovaleriansäure, Chinasäure und Shikimisäure. Von den einzelnen Stämmen unterschiedlich verwertet wurden die Substrate Lactat, Pyruvat, Acetat, Citrat und Benzoat. Kein Wachstum wurde auf 2.3-Butandiol, Malonat, L-Serin, Testosteron, L-Citrullin, L-Tryptophan, Cytosin, Saccharat, Salicylsäure und Nikotinsäure festgestellt. PHB-Grana, als einzige C-Quelle, dem Agar zugesetzt,wurden nicht hydrolysiert.

Auffallend war, daß die Neuisolate mehrere Zucker verwerten konnten und sich gegenüber den meisten getesteten Substraten identisch verhielten. Lediglich bei der Verwertung von Galaktose und 5 organischen Säuren wurden Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen festgestellt. Die Ergebnisse zur Substratverwertung der 6 neuisolierten Stämme sind in Tabelle 7 - kombiniert mit dem Schema der Substratverwertung von Wasserstoffbakterien von Davis et al. (1970 - dargestellt. Die Neuisolate sind in dieses Schema unmittelbar zwischen den beiden Arten eingefügt worden, mit deren Substratverwertung die größten Ähnlichkeiten festgestellt werden konnten.

Tab. 7: Einordnung der neuisolierten Wirtsbakterien in das Schema der Substratverwertung von Wasserstoffbakterien nach Davis et al. (1970)

	P.flava	Stamm 450	Isolat GA	Isolat GB	Isolat GC	Isolat GD	Isolat GE	Isolat GF	A.paradoxus B.I	A.paradoxus B.II	P.pallleronii	Stamm 362	P.ruhlandii	P.saccharophila	P.facilis	P.delafeldii	A.eutrophus	P.denitrificans
Anzahl der Stämme	1	1	1	1	1	1	1	1	11	5	2	1	1	1	2	5	14	2
Glucose			+	+	+	+	+	+										
Fruktose	1	1	+	+	+	+	+	+	11	5	0	0	0	1	2	5	14	2
Arabinose	1	1	+	+	+	+	+	+	11	5	0	0	0	1	2	5	0	1
Saccharose	1	1	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Maltose	1	1	+	+	+	+	+	+	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Cellobiose	1	1	+	+	+	+	+	+	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Xylose	0	1	+	+	+	+	+	+	11	4	0	0	0	1	1	5	0	0
Galaktose	1	1	+	+	+	-	-	-	11	5	0	0	0	1	2	5	0	1
meso-Inositol	1	1	+	+	+	+	+	+	4	0	2	1	0	0	0	0	0	2
Mannitol	1	1	+	+	+	+	+	+	11	5	0	0	0	0	2	5	0	2
Glycerin	1	1	+	+	+	+	+	+	11	5	2	1	0	0	2	5	0	2
Gluconat			+	+	+	+	+	+										
Saccharat	0	0	-	-	-	-	-	-	9	5	2	1	1	0	0	5	14	0
Malat	1	1	+	+	+	+	+	+	11	2	2	1	0	0	2	0	3	2
Malonat	0	0	-	-	-	-	-	-	10	4	0	0	0	0	2	5	0	2
2.3 Butandiol	0	0	-	-	-	-	-	-	3	0	0	1	1	0	0	0	0	2
L-Serin	0	0	-	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0	0	2	5	0	0

	P.f.	St.450	I.GA	I.GB	I.GC	I.GD	I.GE	I.GF	A.p.BI	A.p.B.II	P.p.	St.363	P.r.	P.s.	P.f.	P.d.	A.e.	P.d.
Anzahl der Stämme	1	1	1	1	1	1	1	1	11	5	2	1	1	1	2	5	14	2
L-Leucin	0	1	+	+	+	+	+	+	11	5	2	1	0	0	2	5	9	2
L-Tryptophan	0	0	-	-	-	-	-	-	7	4	2	0	0	0	0	0	14	0
Shikimisäure			+	+	+	+	+	+										
Salicylsäure			-	-	-	-	-	-										
Nikotinsäure	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	0	14	0
Chinasäure			+	+	+	+	+	+										
Isovaleriansäure			+	+	+	+	+	+										
Cytosin			-	-	-	-	-	-										
L-Citrullin			-	-	-	-	-	-										
Testosteron	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0
Hydrolyse von exogener PHB	0	0	-	-	-	-	-	-	11	5	0	0	0	0	2	5	0	0

Symbole: eigene Versuche: + = Substrat wurde von den Neuisolaten verwertet,
- = Substrat wurde von den Neuisolaten nicht verwertet.

(Die Zahlen bedeuten bei Davis et al. (1970) die Anzahl der getesteten Stämme, die das betreffende Substrat verwerten konnten, diskriminierende Substrate sind unterstrichen.)

3.3. Morphologie der neuen Wasserstoffbakterien

Die Stämme GA, GB, GC, GD, GE und GF wuchsen als blaß- bis zitronengelbe Kolonien, die auf NB-Platten eine leichte Erhöhung in der Mitte und einen fein gezackten Rand hatten. Die Farbwirkung war nicht auf jedem Substrat gleich intensiv und von Wachstumsdichte und Höhenentwicklung der Kolonien abhängig. Auf Zucker-Mineralplatten waren die Kolonien kleiner, hatten eine mehr halbkugelige Form und wirkten insgesamt kompakter. Auf den Mineralplatten waren nach autotropher Inkubation die Kolonien flacher und hatten einen vorwiegend glatten Rand.

Die Stämme verhielten sich gram-negativ. Sie zeigten keine Schleimbildung, auch nicht auf Zucker-Mineralplatten. In Flüssigkeitskulturen im Vollmedium wuchsen die Zellen nicht in jeder Wachstumsphase als homogene Suspension. Bei Dichten unter 1.5 ($OD_{623\,nm}$) wurde die Bildung von Zellaggregaten und Randwachstum an Reagenzgläsern und Kölbchen beobachtet. Diese Aggregate wurden jedoch nur vorübergehend für einige Stunden gebildet und verschwanden wieder bei höherer Dichte. Sie waren offensichtlich von sehr lockerer Konsistenz und ließen sich durch kräftiges Schütteln jederzeit fast ganz wieder aufheben.

Die Zellen der Stämme bildeten in jeder Phase Stäbchen mit abgerundeten Polen. Kurz nach der Zellteilung hatten sie eine ovale Form, die bei dem Stamm GC über einen weiten Bereich der Wachstumskurve besonders ausgeprägt ist. Die Länge der Zellen schwankte zwischen 0.9 bis 2.3 µm, ihre Breite zwischen 0.4 und 0.6 µm (siehe Abbildung 16, Seite 88).

Die Zellen waren beweglich und hatten Geißeln, die in den späten Wachstumsphasen wieder abgebaut wurden und schließlich auch nicht mehr - als abgebrochene Teilstücke etwa - im Kulturmedium festgestellt werden konnten. Bei dem Stamm GC war

der Anteil der begeißelten Zellen geringer. Die Begeißelung der Stämme wurde unter autotrophen Bedingungen mehrmals durch alle Wachstumsphasen im Elektronenmikroskop untersucht. Ebenfalls wurden NB-Kulturen geprüft. In keinem Fall konnte eine laterale Begeißelung beobachtet werden, wie sie in Kontrollen bei den Stämmen 12x (Eberhardt, 1965) und Alcaligenes paradoxus Biotyp I festgestellt wurde. Vielmehr hatten alle Stämme vorwiegend im ovalen Zellstadium eine polare Geißel mit einer charakteristischen Form (siehe Abbildung 16c). Nur bei dem Stamm GF wurde eine einzige Zelle beobachtet, die zwei Geißeln polaren Ursprungs aufwies. Eine Tendenz zu subpolarer Begeißelung ergab sich allerdings mehr oder weniger bei allen Stämmen. Die Geißeln waren mit Längen zwischen 3 und 5 µm in der Regel zweimal so lang wie die Zellen im länglichen Zellstadium. Die Dicke der Geißeln schwankte bei den einzelnen Stämmen zwischen 130 und 180 Å. Daneben wurden bei allen Stämmen Fimbrien polaren und lateralen Ursprungs gesehen, die auch noch vorhanden waren, wenn keine Geißeln mehr festzustellen waren. Diese Fimbrien waren mit einem Durchmesser von 60 bis 90 Å dünner als die Geißeln und vor allem daran zu erkennen, daß sie nicht die starre Form der Geißeln besaßen, sondern wesentlich flexibler waren. Außerdem waren sie etwa doppelt so lang wie die Geißeln.

3.4. Bestimmung von Cytochromen in den Wirtsbakterien

Um Vergleiche mit dem Cytochrommuster anderer Wasserstoffbakterien anstellen zu können, wurden Messungen des Cytochromgehalts von heterotrophen und autotrophen Zellen der neuen Stämme durchgeführt. Von allen sechs Stämmen wurden sowohl die Membranfraktionen wie die löslichen Fraktionen zellfreier Extrakte von Ultraschall-behandelten Zellen bei Zimmertemperatur durch qualitative Messungen von Differenzspektren geprüft.

Abb. 16: Zellmorphologie der Wirtsbakterien
(a) Zellen des Stammes GB im geißellosen Zustand, Uranylac., x 17000, Maßstab = 1000 nm
(b) Zellen des Stammes GC im geißellosen Zustand, Uranylac., x 17000, Maßstab = 1000 nm
(c) polar begeißelte Zellen des Stammes GA, PWS, x 47000, Maßstab = 1000 nm

Die cytoplasmatischen Membranen von allen Stämmen enthielten Cytochrome vom a-, b- und c-Typ in unterschiedlicher Menge. In den Differenzspektren war regelmäßig der α-Peak eines Cytochroms vom a-Typ zu erkennen. Er war allerdings sehr niedrig und erhob sich in den ungünstigsten Fällen - bei den autotrophen Zellen - nur wenig über der Basislinie. Bei den heterotroph in NB-Medium mit 0.5 % Fruktose angezogenen Zellen wiesen die Cytochrome vom c-Typ die höchste Konzentration auf. Der α-Peak vom Cytochrom c war sehr steil, und Cytochrom b war nur als kleine Schulter bei ca. 560 nm zu erkennen (Abbildung 17, Seite 90). Abweichend von diesem einheitlichen Cytochrommuster in den heterotrophen Zellen differierte das Mengenverhältnis der Cytochrome b und c zwischen den einzelnen Stämmen bei autotropher Anzucht im Schüttelkolben. Der α-Peak der Cytochrome c war entweder wie bei den heterotrophen Zellen höher als der Peak für Cytochrom b (Stämme GD, GE und GF, siehe Abbildung 17) etwa gleich hoch (Stamm GC, siehe Abbildung 17) oder niedriger und nur noch als Schulter auf der rechten Seite des Cytochrom-b-Peaks ausgebildet (Stämme GA und GB, siehe Abbildung 17). In den löslichen Fraktionen konnte ebenfalls Cytochrom c nachgewiesen werden, das möglicherweise bei dem Aufschluß der autotrophen Zellen von den Membranen solubilisiert worden war.

Anhand der bisher gemessenen Differenzspektren konnte kein Cytochrom a_2 mit einem Absorptionsmaximum seiner α-Bande bei 625 nm festgestellt werden, wie es als charakteristisch für repräsentative Stämme der Gattung Alcaligenes paradoxus von Davis et al. (1970) beschrieben worden ist. Deshalb wurden zum Vergleich Pyridin-NaOH-Extrakte von gefriergetrockneten Zellen der Stämme GA und GD auf Cytochrome analysiert. Die Zellen stammten aus autotrophen Anzuchten im 10 l- Braun-Biostat-Fermenter und waren in der stationären Phase bei einer $OD_{546\,nm}$ von 10 geerntet worden. Durch die alkalische Pyridinextraktion werden die Proteine der Cytochrome durch Pyridinmoleküle ersetzt. Die daraus resultierenden Pyridin-Haemochrome der Cyto-

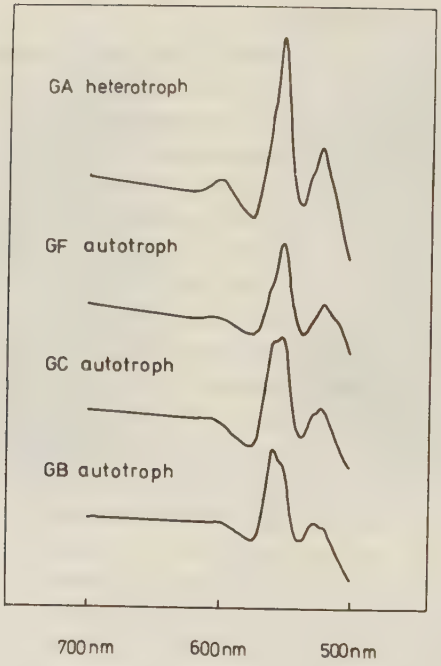


Abb. 17: Cytochrome der neuisolierten Wirtsbakterien: Die Differenzspektren wurden von Membranfraktionen heterotroph und autotroph gewachsener Zellen bei Zimmertemperatur aufgenommen.

chrome a_1 und a/a_3, die als Porphyrinkörper ein Haem A haben, können durch ihren α-Peak bei 587 nm identifiziert werden (Falk, 1964). Tritt ein Absorptionsmaximum im Bereich von 600 bis 620 nm auf, wird dieses gewöhnlich dem Haem a_2 zugeschrieben. Die Differenzspektren von den Pyridinextrakten der Stämme GA und GB wiesen das für a_1- und a/a_3-Haemochrome zu erwartende Absorptionsmaximum bei 587 nm auf. Außerdem ergaben sich erstmals Hinweise auf das Vorhandensein von Cytochrom

a_2 in den neuen Stämmen; beide Differenzspektren hatten einen deutlich breiten α-Peak im Bereich von 620 bis 630 nm.

3.5. Bestimmung und Isolierung von Pigmenten

Von allen sechs neuisolierten Stämmen wurden Aceton-Methanol-Extrakte hergestellt, die offensichtlich sehr polare gelbe Pigmente enthielten. Die Spektren, die von diesen Extrakten aufgenommen wurden, waren weitgehend identisch und unterschieden sich nicht in der Lage ihrer Absorptionsmaxima (Schulter bei 400 bis 404 nm, Maxima bei 426 und 447 nm). Das Spektrum der nach Verseifung mit methanolischer KOH in Äther aufgenommenen Farbstoffe des Stammes GB ist in Abbildung 18 (Seite 93) dargestellt.

Zur Isolierung der einzelnen Komponenten wurde das Pigmentgemisch des Stammes GB nach alkalischer Verseifung mit chromatographischen Methoden eingehender untersucht. Auf der Al_2O_3-III-Säule trennen sich zwei Hauptkomponenten voneinander: Die Komponente I läuft mit 8 bis 10 % Aceton in Petroleumbenzin, während die Komponente II oben im Säulenkopf auch nach Zugabe von 30 % Aceton hängenbleibt. Nach dem Ausstoßen der Säule wurde aus der sehr polaren Zone die Komponente II mit dem Extraktionsgemisch Methanol : Aceton = 1 : 1 eluiert. Eine derartige Trennung der Pigmente in zwei Komponenten ließ sich auf Kieselgel-Dünnschichtplatten wegen zu starker Schwanzbildung nicht erreichen. Die Rf-Werte der Pigmente, ihre Absorptionsmaxima und die Verteilungskoeffizienten sind in der Tabelle 8 (Seite 92) zusammengefaßt. Die Absorptionskurven der Komponente I in Äther (b1), in Petroleumbenzin (b2) und in Aceton (b3) sind ebenfalls in Abbildung 18 (Seite 93) dargestellt.

Aufgrund des chromatographischen Verhaltens und nach der Struktur der Absorptionsspektren zu urteilen, könnte es sich bei den Pigmenten um sehr polare Carotinoide handeln. Die Mas-

Tab. 8: Zusammenstellung der Rf-Werte, Verteilungskoeffizienten und Absorptionsmaxima der Pigmente des Stammes GB nach ihrer chromatographischen Trennung

		I	II
Absorptionsmaxima (nm)	Petroleumbenzin	(400) 420 446	(376) 396 420 448
	Äther	(402) 422 446	(402) 423 446
	Aceton	(402) 423 445	402 422 445
	Methanol	(398) 422 (448)	(400) 422 (445)
Rf-Werte	Sch + Sch No 287 30 % +)	0.98	0.80
	Sch + Sch No 288 20 % +)	0.71	
	10 % +)	0.56	0.41
	Kieselgel G (0.5 mm)		
	20 %	0.30	0.24
	30 %	0.54	0.48
Elutionsgemisch	Al_2O_3-III	8 - 10 % Aceton in Petroleumbenzin	mit 30 % Aceton nicht eluierbar (s. Text)
Verteilungsverhältnisse	95 % Meth.: Petroläther	87 : 13	99.3 : 0.7
	85 % Meth.: Petroläther	50 : 50	94 : 6
	74 % Meth.: Petroläther	-	90 : 10

+) Aceton in Petroleumbenzin

senspektren weisen auf Verbindungen mit 25 C-Atomen (Komponente I) und 23 C-Atomen (Komponente II) hin (K. Schmidt, pers. Mitteilung). Wahrscheinlich liegen Apo-Carotinoide vor. Weitere Untersuchungen zur chemischen Struktur dieser gelben Farbstoffe wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

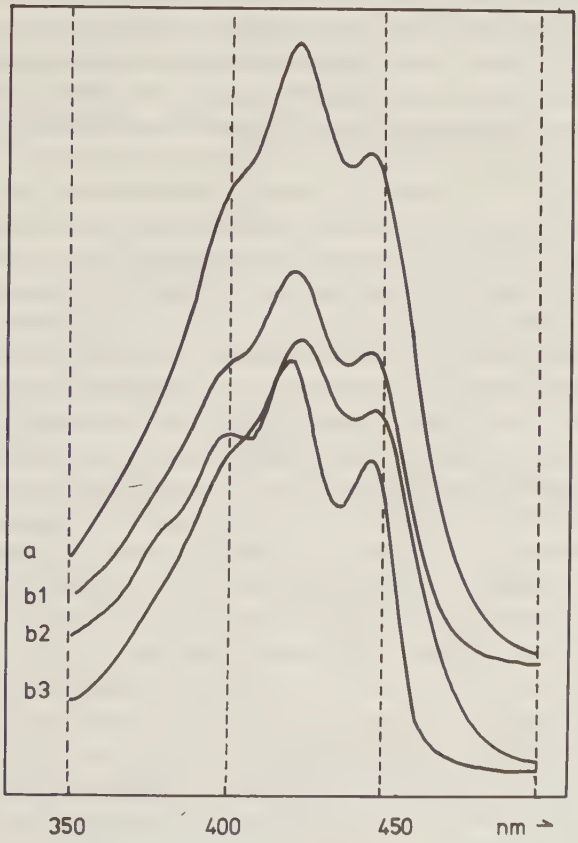


Abb. 18: Pigmente der Wirtsbakterien
a: Absorptionsspektrum der Gesamtpigmente des Stammes GB, nach Verseifung in Äther aufgenommen.
b: Spektren der Komponente I, nach der Isolierung in Äther (b1), in Petroleumbenzin (b2) und in Aceton (b3) aufgenommen.

DISKUSSION

I. Intakte Bakteriophagen für Alcaligenes eutrophus

Von den Phagen, die vor Beginn dieser Arbeit für Wasserstoffbakterien isoliert worden waren (siehe Einleitung), konnten nur die Pseudomonas facilis-Phagen (Pootjes, 1964; Pootjes et al., 1966) auf ihre lytische Aktivität gegen die Alcaligenes-Stämme der Institutssammlung geprüft werden; nicht prüfen ließ sich der Alcaligenes eutrophus-Phage, der für die Stämme H20 und Z-1 (Neuisolat) aus Bodenproben isoliert worden war (Kharina et al., 1968). Er stand trotz persönlicher Anfrage bei den Autoren für Untersuchungen nicht zur Verfügung. Der H20-Phage gehört mit seinem kontraktilen Schwanz von 1200 Å Länge und 200 Å Breite entsprechend dem Bradley-Schema zu den Phagen der Gruppe A. Sein Kopf soll die seltene Symmetrieform des Oktaeders und einen Durchmesser von 1000 Å haben. Zum Zeitpunkt seiner Isolierung war die Vermehrung dieses Phagen suboptimal, weil Lysate mit einem Titer von nur 1×10^4 bis 1×10^5/ml erhalten wurden, wobei die Autoren selbst die mangelnde Reproduzierbarkeit ihres Phagensystems eingestehen. Ob dieser Phage sich eventuell auf einem der 36 hiesigen Alcaligenes-Stämme, die in der vorliegenden Arbeit untersucht worden sind, ergiebiger vermehrt und ob sich vielleicht durch Variationen in der Methodik eine höhere Reproduzierbarkeit ergeben hätte, konnte leider nicht geprüft werden.

Nach Beginn der vorliegenden Arbeit ist der zweite Bericht über Bakteriophagen für Wasserstoffbakterien der Arbeitsgruppe um Rautenshtein erschienen (Rautenshtein et al., 1973). Daß der H20-Phage für weitergehende Untersuchungen ungeeignet erscheint, kann dieser Darstellung entnommen werden. Neue Erkenntnisse bezüglich dieses H20-Phagen wurden nicht mitgeteilt, Plaquegröße und Titer sind so minimal geblieben, wie schon 1968 berichtet wurde. Bei einem Kreuztest zum Studium der Lysogenie wurde allerdings ein neuer Phage für die Stämme Z-1 und

H16 von Alcaligenes eutrophus entdeckt, der als temperent bezeichnet wurde. Die Autoren vermuteten aufgrund von elektronenmikroskopischen Untersuchungen, daß es sich um einen Stummelschwanzphagen handelt, dessen ikosaedrischer Kopf einen Durchmesser von 580 bis 600 Å hat. Ansonsten wurden keine weiteren Angaben gemacht. Insgesamt gesehen sind beide Berichte der Arbeitsgruppe um Rautenshtein bezüglich der Alcaligenes eutrophus-Phagen wegen ihrer Darstellungsweise schwierig zu beurteilen. Immerhin läßt sich aus ihnen schließen, daß es offenbar nicht leicht ist, für Alcaligenes eutrophus Phagen zu isolieren, die sich im Labor gut handhaben lassen.

Wie schwierig sich die Phagensuche mit den Alcaligenes-Stämmen der hiesigen Institutssammlung gestaltet hat, kann aus einem früheren Mißerfolg mit über 100 Bodenproben (Blackkolb, Flaskerud, pers. Mitteilung) und dem nur teilweisen Erfolg der in dieser Arbeit mitgeteilten Versuche entnommen werden. Auch mit variierten Methoden, wie Mitomycin-C-Induktion und besserer Ausrüstung (Elektronenmikroskopie), konnten ebensowenig wie in den früheren Versuchsserien intakte Bakteriophagen für die Alcaligenes-Stämme isoliert werden. Bodenproben von dem Platz, von dem der bekannte Stamm H16 isoliert worden war (Wilde, 1961), enthielten z.B. intakte Phagen, jedoch nicht für den Stamm H16, sondern für Wasserstoffbakterien anderer Gattungen, welche als Wirtsbakterien für diese Phagen neu isoliert werden mußten. In wieweit durch latente Gene der Immunitätsregion infolge der extremen Verbreitung der defekten Lysogenie in den Alcaligenes-Stämmen eine Isolierung von intakten Bakteriophagen für die Spezies Alcaligenes eutrophus erschwert worden ist, kann nur vermutet werden. Eine Gewinnung intakter Phagen für Alcaligenes eutrophus kann jedoch nur dann verhindert worden sein, wenn der aus dem Boden zu isolierende Phage die gleiche Immunität gehabt hätte wie der defekte Phage in dem zu prüfenden Stamm.

II. Intakte Bakteriophagen für sonstige Wasserstoffbakterien

Die fünf virulenten Stummelschwanzphagen, die von Pootjes für Pseudomonas facilis isoliert worden waren (Pootjes, 1964; Pootjes et al., 1966), waren die ersten Phagen, die für ein Wasserstoffbakterium beschrieben worden sind. Sie haben eine Latenzzeit von 35 bis 65 Minuten mit einer Wurfgröße von 20 bis 90 Partikeln unter heterotrophen Wachstumsbedingungen, sind serologisch verwandt, aber nicht identisch und haben ein sehr begrenztes Wirtsspektrum. Unter autotrophen Bedingungen können sich nur zwei der Phagen vermehren (Korant und Pootjes, 1968). Für einen der Phagen, SH-133, konnte nachgewiesen werden, daß die stark verringerte "efficiency of plating" (EOP) und Wurfgröße bei gleichbleibender Adsorption unter autotrophen Bedingungen nicht durch verminderte DNA- oder RNA-Synthese hervorgerufen wird. Vielmehr vermuteten die Autoren, daß infolge verringerter Proteinsynthese nach der Infektion autotropher Zellen ein bei der Phagenreifung benötigtes spätes Protein nicht in ausreichendem Maße synthetisiert werden kann (Aron und Pootjes, 1973a). Außerdem wurde die Notwendigkeit einer fortlaufenden Energiegewinnung zur Phagenvermehrung in heterotroph und autotroph gewachsenen Zellen nachgewiesen (Aron und Pootjes, 1973b).

Kaum untersucht worden ist demgegenüber der Z-33-Phage, den Rautenshtein et al. (1973) für ein gelbes Wasserstoffbakterium, Hydrogenomonas pantotropha, beschrieben hatten. Nach Davis et al. (1969) sollten Bakterien der Art Hydrogenomonas pantotropha zur Species Pseudomonas flava gezählt werden. Der Z-33-Phage produzierte winzige Plaques, und es konnten nur Lysate mit sehr niedrigem Titer gewonnen werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Lysate zeigten kontraktile Phagen mit einer Schwanzlänge von 1460 Å und einem Kopfdurchmesser von 530 Å.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sieben Bakteriopha-

gen und sechs Wirtsbakterien nach dem Simultanisolierungsverfahren neu isoliert. Bei den Wirtsbakterien handelte es sich ebenfalls um gelbe Wasserstoffbakterien. Die Problematik ihrer taxonomischen Einordnung soll im Schlußkapitel der Diskussion dargestellt werden. Die Isolierung der neuen Bakteriophagen aus Anreicherungskulturen für Wasserstoffbakterien konnte durch Benutzung eines Elektronenmikroskops gezielter als mit den üblichen Methoden der Phagensuche durchgeführt werden. Denn es wurden nur solche Anreicherungskulturen zur Simultanisolierung benutzt, die sich in der elektronenmikroskopischen Analyse als phagenpositiv erwiesen hatten. Die neuen Phagen wurden unter autotrophen Bedingungen isoliert und produzierten unter diesen Bedingungen auf festen Mineralmediumplatten 2 bis 7 mm große, trübe Plaques, die mit Ausnahme des Phagen gb eine mehr oder weniger ausgeprägte Ringstruktur aufwiesen. Plaquemorphologie mit ähnlicher Ringstruktur wurde in der Literatur für Mycobakteriophagen beschrieben (Kraiss et al., 1973), von denen einer, der Phage Bo1, nach 10 Tagen Inkubation Plaques mit einem Durchmesser von 9 mm und bis zu 7 konzentrischen Ringen produzierte.

Während ein Plaquetest unter autotrophen Bedingungen mit den neuisolierten Bakteriophagen keine Schwierigkeiten bereitete, ist es noch nicht gelungen, heterotrophe Milieubedingungen für einen gemeinsamen Plaquetest aller sieben Phagen zu finden. Die heterotroph entstandenen Plaques unterschieden sich von den autotroph gewachsenen durch ihre stark reduzierten Durchmesser und den durchweg klaren Hintergrund. Die EOP war auf geeigneten heterotrophen Platten entweder gleich oder schlechter als unter autotrophen Bedingungen. In dieser Hinsicht unterscheiden sich die neuisolierten Bakteriophagen offensichtlich von den schon erwähnten Pseudomonas facilis-Phagen, von denen sich nur zwei unter autotrophen Bedingungen vermehren können, wobei die EOP gegenüber heterotrophen Wachstumsbedingungen stark vermindert war.

Sechs der neuisolierten Bakteriophagen sind zudem in der Lage, ihre Wirtsbakterien zu lysogenisieren wie der Z-1/H16-Phage für Alcaligenes eutrophus (Rautenshtein et al., 1973). Diese Phagentypen unterscheiden sich damit von den Pseudomonas facilis-Phagen und dem Z-33-Phagen für Hydrogenomonas pantotropha, die alle virulent sind. Noch nicht nachgewiesen wurde die temperente Natur des neuisolierten Phagen gb, der deutlich trübe Plaques produzierte. Wegen ihrer Fähigkeit zur Lysogenisierung können die neuisolierten Bakteriophagen außer in Lysaten auch als Prophagen in lysogenen Bakterien gehalten werden. Ein Verlust des Phagen gc durch Inaktivierung im Lysat, wie er von Rautenshtein et al. (1973) für andere Phagen von Wasserstoffbakterien berichtet wurde, konnte auf diese Weise trotz seiner relativen Instabilität vermieden werden. Die übrigen sechs Phagen waren stabil. Die Lysatherstellung nach der Plattenmethode bereitete außer für den Phagen ga, für den nur ein Titer von 1×10^6/ml erhalten wurde, keine Schwierigkeiten. Die Lysate der übrigen Phagen hatten einen Titer von 1×10^9/ml bis 2×10^{10}/ml. Bei größerer Erfahrung mit den jeweiligen Phagensystemen dürfte eine nennenswerte Steigerung möglich sein (Adams, 1959).

Bei der weiteren Charakterisierung ergaben sich Hinweise, daß die neuisolierten Bakteriophagen zum Teil einander ähnlich oder sogar nahe miteinander verwandt sind. Während der Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Gradienten hatten fünf Phagen eine spezifische Dichte im Bereich von 1.474 bis 1.476 g/cm^3. Nur die spezifische Dichte des Phagen gb lag mit 1.486 g/cm^3 etwas höher. Die stärksten Hinweise auf Verwandtschaft ergaben sich für die Phagen gd1, gd2, ge und gf. Sie stammten alle aus derselben Anreicherung und ihre Indikatorstämme waren zum Teil ohne Reduktion der EOP austauschbar. Die Tatsache, daß lysogene Stämme der drei Wirtsbakterien dieser Phagen bei einem quantitativen Immunitätstest gegen Überinfektion der Phagen aus der Anreicherung 43 immun waren, stützt den Verdacht sehr naher Verwandtschaft. Es bleibt zu prüfen, ob es

sich bei den verschiedenen Phagen der Anreicherung 43 nicht letzten Endes um natürlich vorkommende Plaquemutanten eines Phagen handelt. Möglicherweise zeigen diese Phagen auch deshalb so viele Gemeinsamkeiten, weil der ursprüngliche Phage bei der Vermehrung in den einzelnen Wirtsbakterien durch Modifikation nur geringfügig verändert wurde, aber als neuer Phage erscheint.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung lieferte ebenfalls Hinweise für Ähnlichkeiten und Gemeinsamkeiten unter den neuisolierten Phagen. Sie erbrachte sogar den Nachweis, daß einige der Phagen in ihrer Struktur identisch waren und höchstens in wenigen Abmessungen geringfügige Abweichungen aufwiesen. Aufgrund der Unterschiede im Schwanzaufbau ließen sich die sieben neuisolierten Bakteriophagen in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe wurden die Phagen mit kontrahierbarem Schwanz (ga, gb), zur zweiten Gruppe die Phagen mit langem, nicht kontrahierbarem Schwanz (gc, gd1, gd2, ge und gf) gezählt. Die intakten Köpfe aller Phagen erscheinen auf den Abbildungen als Projektionen in die Ebene nur mit regelmäßiger hexagonaler Form. Deshalb darf angenommen werden, daß die Köpfe der neuisolierten Phagen Ikosaeder darstellen (Horne und Wildy, 1961; Caspar und Klug, 1962). Die Schwänze beider Phagentypen hatten eine definierte Oberflächenstruktur, die einen Aufbau der Schwänze aus regelmäßig angeordneten morphologischen Untereinheiten und eine helikale Symmetrie wahrscheinlich macht, was bei Schwänzen ähnlich aussehender Phagen schon nachgewiesen worden war (Tikhonenko, 1970).

Die Phagen ga und gb (Gruppe I) sind in ihrem Aussehen dem bekannten E.coli-Phagen T4 ähnlich. Sie haben allerdings viel kürzere Schwanzfibern und einen nur halb so großen Kopf. Die Fähigkeit des Phagen ga zur Kontraktion seines Schwanzes wurde durch Mikrophotographie (siehe Abbildung 10b, Seite 69) nachgewiesen. Daß auch der Phage gb in analoger Weise kontrahieren kann, darf wegen des gleichen Aufbaus seines Schwanzes

mit innerer Röhre und äußerer Scheide trotz fehlender Abbildungen angenommen werden.

Die in der Gruppe II zusammengefaßten Phagen gc, gd1, gd2, ge und gf besaßen längere Schwänze als die Phagen der Gruppe I. Die Schwänze waren außerdem nicht kontrahierbar. Da sie im elektronenmikroskopischen Bild sehr unterschiedlich gebogen waren, wurde angenommen, daß sie auch in vivo eine starke Flexibilität besaßen. Wegen der langen nicht kontrahierbaren Schwänze sind die Phagen der Gruppe II in ihrer Morphologie dem bekannten E.coli-Phagen Lambda vergleichbar. Die Schwänze aller fünf Phagen besaßen einen Appendix, der im ausgestreckten Zustand, manchmal auch in der Form einer Zange zusammengezogen oder eingerollt als Kreis gesehen wurde. Diese besondere Flexibilität und die mögliche Fähigkeit, eine Zangenbewegung durchzuführen, erlaubten die Schlußfolgerung, daß der Appendix für die Phagen der Gruppe II das Adsorptionsorganell darstellt. Die elektronenmikroskopische Analyse von Adsorptionsversuchen mit den Phagen gd1 und gf lieferte zudem den Nachweis, daß dem Kontakt dieser Phagen mit den Zellen der betreffenden Wirtsbakterien eine spezifische Adsorption an die Fimbrien der Zellen vorausgegangen ist. Während eine derartige Fähigkeit von Bakteriophagen mit langem, nicht kontrahierbarem Schwanz zu spezifischer Adsorption an Fimbrien erst in jüngster Zeit von Bradley beschrieben worden ist (Bradley, 1973 a und b; Bradley und Pitt, 1974), war die Fimbrien- bzw. Pilus-Abhängigkeit der kleinen "kugelförmigen" RNA-Phagen und der Filament-Phagen mit Einzelstrang-DNA schon früher untersucht worden (Tikhonenko, 1970). Von den größeren Bakteriophagen, die einen Kopf und einen langen Schwanz besitzen, war lange Zeit nur bekannt, daß einige von ihnen spezifisch an Geißeln von Bakterien adsorbieren konnten (Meynell, 1961; Jollick, 1972; Krizsanovich et al., 1973). Eine weitere Besonderheit einiger Phagen aus der Gruppe II hat bis jetzt noch keine Erklärung gefunden: Die Phagenlysate gd1 und ge enthielten zu einem geringen Prozentsatz Phagen mit überlangen Schwänzen, die annähernd doppelt so lang wie der normale Phagenschwanz waren.

Die Kenntnis der Struktur der neuisolierten Phagen ermöglichte ihre Einordnung in das Schema, das von Bradley zur Klassifizierung der Bakteriophagen aufgestellt worden ist (Bradley, 1967). Danach gehören die Phagen ga und gb zur Gruppe A und die Phagen gc, gd1, gd2, ge und gf zur Gruppe B des Bradley-Schemas. Aufgrund dieser morphologischen Klassifizierung ist laut Bradley zu erwarten, daß die neuen Phagen beider Gruppen Doppelstrang-DNA als Nukleinsäure in ihren Köpfen enthalten (Bradley, 1967).

Die sieben neuisolierten Bakteriophagen bieten sich also für weitere Untersuchungen an: 1. Sie sind stabil. 2. Der Titer der Lysate ist nicht gering. 3. Die temperente Natur der Phagen kann bis auf den Phagen gb als gesichert gelten.

Erste Versuche zum Nachweis von Transduktionsvorgängen mit dem Phagen gd2 sind ergebnislos verlaufen. Die Experimente zum Nachweis von Genübertragung sollen im größeren Rahmen später mit allen Phagen durchgeführt werden.

III. Das Phänomen der defekten Lysogenie

Während die Versuche zur Isolierung intakter Phagen für die Art Alcaligenes eutrophus in der hiesigen Arbeitsgruppe erfolglos geblieben sind, gelang in zahlreichen Fällen die Entdekkung von Partikeln, deren Verwandtschaft mit Bakteriophagen offensichtlich ist. Es handelte sich dabei um Strukturen, die nur noch aus Phagenschwänzen (Inco-Partikel) oder aus Phagenschwanzkomponenten (Polysheath) bestanden. Die Analogie dieser Partikeln zu Schwänzen kontrahierbarer Phagen war eindeutig. Aus der Tatsache, daß solche defekten Phagen von den Alcaligenes-Laborstämmen unter Induktionsbedingungen bzw. zum Teil auch spontan synthetisiert werden können, darf die Schlußfolgerung gezogen werden, daß diese defekten Phagen als defekte

Prophagen auf dem Chromosom der induzierten Bakterienstämme genetisch lokalisiert sein dürften. Ein Nachweis der chromosomalen Lokalisierung dieser Phagenschwanz-ähnlichen Partikeln, wie er von Kageyama et al. (1970 a und b) für den Pyocin R2-Faktor durch Konjugation und Transduktion erbracht worden ist, steht allerdings noch aus. Was den Grad der Defektivität der Prophagen in den Alcaligenes-Stämmen angeht, so können Rückschlüsse aus der elektronenmikroskopischen Analyse der gefundenen Strukturen gezogen werden: Ein defekt lysogenes Bakterium, das nur noch ein Scheidenprotein für eine Polysheath-Aggregation synthetisieren kann, dürfte weniger Phagengene enthalten als ein Bakterium, das noch einen mehr oder weniger intakten kontrahierbaren Phagenschwanz (Inco-Partikel) zu produzieren vermag. Die Tatsache, daß nicht nur einzelne, sondern zwei Drittel der untersuchten Alcaligenes-Laborstämme sich als defekt lysogen erwiesen haben, stellt in der Literatur keinen Einzelfall dar. Amako et al. (1970) fanden bei nahezu allen von 17 untersuchten Stämmen von Pseudomonas fluorescens induzierbare Phagenschwanz-ähnliche Partikeln, und Tohyama et al. (1972) konnten bei 30 untersuchten Lactobacillus-Stämmen nachweisen, daß mehr als die Hälfte von ihnen defekt lysogen sein mußte. Ebenso ist die Entdeckung defekter Bakteriophagen kein ungewöhnliches Ergebnis eines "Screening"-Programms zur Isolierung von temperenten Phagen, wenn dabei Mitomycin-C-Induktion und Elektronenmikroskopie miteinander kombiniert angewandt werden. Auch Tohyama et al. (1972) konnten unter den zahlreich induzierten temperenten Phagen nur zwei Partikeln finden, die zur Plaquebildung fähig waren.

Die Unfähigkeit zur Plaquebildung auf irgendeinem Wirtsbakterium unterscheidet nach Garro und Marmur (1970) die defekten Phagen von intakten Bakteriophagen. Die gegenwärtig in der Literatur bekannten defekten Bakteriophagen lassen sich entsprechend der Art ihrer Defektivität in drei Gruppen einteilen (Garro und Marmur, 1970):

I. Partikeln, die fast ausschließlich DNS des Wirtsbakteriums enthalten,
II. Partikeln, die phagenspezifische DNA enthalten,
III. Partikeln, die mehr oder weniger frei von DNA sind und Phagenschwanzstrukturen ähneln.

Partikeln der Gruppe I können als transduzierende Phagen (Watson, 1970) von großer Bedeutung sein. Defekte Bakteriophagen der Gruppe II sind in der Virologie zunächst als künstliche bzw. spontane Mutanten zur Erforschung der Integration von temperenten Phagen oder zum Studium der allgemeinen Physiologie der Phagen von Interesse gewesen (Stent, 1963). Später wurden für einige Bacillus- und Lactobacillus-Spezies sogenannte Killer-Partikeln beschrieben (Stickler et al., 1965; De Klerk und Hugo, 1970; Tohyama et al., 1972). Die Unfähigkeit solcher Killer-Partikeln zur Lysogenisierung von Bakterien wird von Seaman et al. (1964) am Beispiel des induzierbaren Bacillus subtilis-Phagen PBSX damit erklärt, daß dieser defekte Phage bei seiner Adsorption die sensitive Bakterienzelle tötet und seine virale DNA somit für die Expression verloren geht.

Die defekten Phagenpartikeln der Gruppe III sind durch die ausschließlich genetisch orientierte Forschung in der Regel kaum beachtet worden und haben erst durch die Einführung elektronenoptischer Techniken in die Virologie eine Aufwertung erfahren. Beruht doch die Entdeckung und Charakterisierung phagenschwanzähnlicher Partikeln und damit der Nachweis von defekter Lysogenie vieler Bakterienstämme auf elektronenmikroskopischen Beobachtungen (Lotz, im Druck). Die Richtigkeit der Voraussage von Stent, der 1963 gemeint hatte, daß viele defekt lysogene Bakterienstämme in der Natur existierten, deren lysogener Charakter erst noch nachgewiesen werden muß, hat sich inzwischen in Bezug auf die defekten Phagen der Gruppe III für viele Bakterienarten erwiesen (Pseudomonaden: Kageyama und Egami, 1962; Myxobakterien: Reichenbach, 1967; Enterobakterien: Coetzee et al., 1968; Clostridien: Iida und

Inoue, 1968; Rhizobien: Lotz und Mayer, 1972). Auch die Phagenschwanzstrukturen, die bei der Untersuchung der Alcaligenes-Stämme der hiesigen Institutssammlung gefunden werden konnten, sind in die Gruppe III der defekten Phagen einzuordnen.

Die Ergänzung biochemischer, genetischer und serologischer Verfahren in der Virologie durch Methoden der Elektronenmikroskopie hat außer der Aufwertung genetisch nicht interessierender defekter Phagen auch die Einordnung von scheinbar nicht miteinander verwandten Strukturen und Wirkungsprinzipien in die verschiedenen Gruppen der defekten Bakteriophagen erleichtert bzw. ihre Abgrenzung erst ermöglicht. Dabei ist im wesentlichen an Rhapidosomen (Lewin, 1963) und andere tubuläre Strukturen gedacht, die in Zellen von Mikroorganismen gefunden worden sind (Iterson et al., 1967; Gumpert und Taubeneck, 1968) sowie an Colicine und andere Bacteriocine, die von einigen Bakterienarten produziert werden (Bradley, 1967; Brandis und Smarda, 1971):

Die von Lewin (1963) bei Saprospira grandis entdeckten Rhapidosomen erwiesen sich bei späteren Untersuchungen (Delk und Decker, 1972) als Partikeln, die kontrahierbaren Phagenschwänzen gleichzusetzen sind. Ihre Besonderheit besteht darin, daß sie nur noch aus einer kontrahierten Scheide und einer inneren Röhre (Core) bestehen, während eine Basisplatte oder Fibern ganz fehlen. Die Bezeichnung Rhapidosomen wurde in der Folgezeit von mehreren Autoren übernommen und für durchaus nicht identische stäbchenförmige Strukturen angewandt, die in Bakterienzellen lokalisiert waren bzw. aus Bakterienzellen entlassen wurden (Pate et al., 1967; Yamamoto, 1967; Iida und Inoue, 1968; Clark-Walker, 1969; Amako et al., 1970 und Adhikari und Chatterjee, 1972). Daneben wurden stäbchenförmige Strukturen in Zellen von Mikroorganismen als Mikrotubuli bezeichnet (Iterson et al., 1967). Dabei wurde von Gumpert und Taubeneck (1968) der Bakteriophagenursprung solcher tubulärer Strukturen betont, während Pate et al. (1967) für Tubuli in den Zellen von Chondrococcus

columnaris eine Entstehung aus Zellmembranen vorschlugen.

In einem Übersichtsartikel, der sich ausschließlich mit den defekten Bakteriophagen der Gruppe III, den phagenschwanzähnlichen Partikeln befaßt, versucht Lotz (im Druck) eine Klärung der Begriffe: Er schlägt vor, die Bezeichnung Rhapidosomen nur noch für die charakteristischen Phagenpartikeln von Saprospira grandis, welche keine Basisplatte besitzen, anzuwenden. Morphologisch ähnliche Partikeln anderer Bakterienarten sollten vielleicht rhapidosomenähnlich genannt werden. Dadurch könne die Klassifizierung von tubulären Strukturen, die höchstwahrscheinlich aus zellulären Membransystemen entstanden sind (Kuhrt und Pate, 1973), als Rhapidosomen vermieden werden. Außerdem gliedert Lotz die ganze Vielfalt der phagenschwanzähnlichen Partikeln in drei Klassen:

I. Partikeln, die kontrahierbaren Phagenschwänzen gleichen,
II. Partikeln, die langen Röhren ähneln,
III. Partikeln, die Phagenschwänzen ohne Scheiden ähneln.

In die Gruppe I dieser Einteilung gehören die Rhapidosomen von Saprospira grandis, die Inco-Partikeln von Rhizobium spec (Lotz und Mayer, 1972); hierzu gehören sicher die Phagenschwänze, die von sieben Alcaligenes-Stämmen der hiesigen Institutssammlung synthetisiert und ins Kulturmedium entlassen wurden. Zur Gruppe II der phagenschwanzähnlichen Partikeln werden zwei in Längsrichtung polymerisierte Strukturen des Schwanzes kontrahierbarer Phagen gezählt: Einerseits die Polysheaths, starre Röhren mit einem äußeren Durchmesser von 20 bis 30 nm, die aus der äußeren Scheide entstanden sind, andererseits die Polycores, flexible, lange Stäbchen mit einem geringeren, äußeren Durchmesser von 5 bis 10 nm, die aus der inneren Hohlröhre, dem Core, des Phagenschwanzes entstanden sind. Die tubulären Strukturen in den Zellen von Alcaligenes-Stämmen, die in diesem Labor untersucht worden sind, konnten als Polysheaths beschrieben werden. Sie gehören also in die Gruppe II der phagenschwanzähnlichen Partikeln. In die Gruppe III sind diejeni-

gen defekten Phagenpartikeln einzuordnen, die in ihrem morphologischen Aufbau dem flexiblen Schwanz beispielsweise des E.coli-Phagen Lambda ähneln. Solche Strukturen sind unter anderem als Pyocine beschrieben worden (Takeya et al., 1969) und werden von Bakterien der Gattung Pseudomonas produziert.

Ebenso wie bei der morphologischen Einordnung der phagenschwanzähnlichen Partikeln scheint sich auch bezüglich der antibakteriellen Wirkung von defekten Phagen und Bacteriocinen ein Klärungsprozeß in der Literatur abzuzeichnen. Bacteriocine sind nach Nomura (1967) Proteinsubstanzen, die von bestimmten Bakterienstämmen synthetisiert werden und eine letale Wirkung gegen andere Stämme derselben oder nahe verwandter Arten ausüben. Sie werden entsprechend der Klassifizierung der Bakterienstämme, in deren Kulturen sie im Verlauf des Wachstums angetroffen werden können, benannt. Ihre Proteinnatur und insbesondere die enge Spezifität ihrer bacteriociden Wirkung unterscheidet sie von den klassischen Antibiotica. Diese hohe Spezifität ihrer Wirkung gegenüber Bakterien ist analog der lytischen Aktivität der meisten Phagen. Nach Bradley (1967) gibt es grundsätzlich zwei Arten von Bacteriocinen, die hitzestabilen niedrigmolekularen Substanzen und die hochmolekularen Partikeln, deren phagenähnlicher Charakter durch Sichtbarmachen ihrer Struktur im Elektronenmikroskop offensichtlich geworden ist. So ist zum Beispiel die bacteriocide Wirkung der Inco-Partikeln von Rhizobium spec. nachgewiesen worden (Lotz und Mayer, 1972). Eine ähnliche lytische Aktivität kann für die Inco-Partikeln der sieben Stämme aus der Spezies Alcaligenes eutrophus erwartet werden, deren Nachweis durch Induktion und Elektronenmikroskopie gelungen ist. Die Prüfung auf bacteriocide Wirkung und die Suche nach sensitiven Bakterienstämmen ist allerdings noch nicht erfolgt. Bezüglich der Eingliederung solcher antibakteriell wirksamer defekter Phagen als hochmolekulare Bacteriocine verwies Nomura (1967) auf die nahe Verwandtschaft von Bacteriocinen sowohl zu Bakteriophagen wie zu F-Faktoren. Die Diskussion in der neu-

eren Literatur (Brandis und Smarda, 1971; Reeves, 1972) scheint dahin zu tendieren, daß alle antibakteriellen Substanzen, die von ihrer Struktur her klare Ähnlichkeiten mit Phagen (Killer-Partikeln) bzw. mit Fragmenten von Phagen (Inco-Partikeln) aufweisen, nicht mehr zu den Bacteriocinen gezählt werden sollen. Brandis und Smarda (1971) nehmen beispielsweise die Auflösung der Struktur des bekannten Colicin 15 als defekter Phage, die mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gelang (Menningmann, 1965), zum Anlaß, dieses antibakterielle Agens aus der Klasse der Bacteriocine auszuschließen. Reeves (1972) will nur noch antibakterielle Proteine, die mit Zellwandkomponenten assoziiert sind, oder Enzyme, die Zellyse hervorrufen, als echte Bacteriocine gelten lassen.

Während man aber einerseits solche Colicine, die als defekte Phagen erkannt wurden, aus der Klasse der Bacteriocine ausschließen will, wird es andererseits für möglich gehalten, daß colicinogene Faktoren im Laufe der Evolution durch einen ähnlichen Abbau von Prophagen entstanden sein können wie die defekten Prophagen (Brandis und Smarda, 1971). Zur Entstehung von defekten Prophagen äußerten Luria und Darnell (1968), daß die Eigenständigkeit des betreffenden Virus als unabhängiges genetisches System durch zunehmende Mutation des Prophagen zur Defektivität verloren geht. Die weitere Existenz des Virus ist dann an das Überleben des betreffenden defekt lysogenen Bakterienstammes gebunden.

IV. Probleme bei der taxonomischen Einordnung der Wirtsbakterien

Bei der Charakterisierung der neuen Wirtsbakterien mußte als erste Eigenschaft ihre Befähigung zur Oxidation von Wasserstoff geprüft werden, weil im Rahmen der vorliegenden Arbeit Bakteriophagen ausschließlich für "Knallgas"-Bakterien iso-

liert werden sollten. Aus diesem Grunde ist das chemolithiautotrophe Wachstum der Wirtsbakterien in Flüssigkeitskultur ausführlicher untersucht worden. Es konnte nicht nur nachgewiesen werden, daß die neuisolierten Stämme echte Wasserstoffbakterien sind, sondern auch, daß sie in der Massenanzucht unter autotrophen Bedingungen genauso leistungsfähig sind wie die bisher favorisierten Alcaligenes-Stämme. Alle übrigen Versuche zur Beschreibung der Wirtsbakterien waren ausschließlich mit taxanomischer Zielsetzung durchgeführt bzw. begonnen worden. Schließlich wäre eine Charakterisierung der neuisolierten "Knallgas"-Phagen ohne Angabe des Wirtsbakteriums unvollkommen geblieben.

Die Taxonomie der Wasserstoffbakterien ist erheblich komplizierter geworden, seit es sich als problematisch erwiesen hat, alle aeroben chemolithotrophen Bakterien, welche die Energiegewinnung durch Wasserstoff als gemeinsames physiologisches Merkmal aufweisen, einfach der Gattung Hydrogenomonas zuzuordnen, wie es Jensen in seinen "Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems" vorgeschlagen hatte (Orla-Jensen, 1909). Inzwischen gilt das Genus Hydrogenomonas als obsolet, und die gram-negativen Wasserstoffbakterien wurden von Davis et al. (1969, 1970) in die Gattungen Paracoccus, Alcaligenes und Pseudomonas eingereiht bzw. aufgeteilt. Schon vorher waren einige gram-positive Wasserstoffbakterien von Hirsch den Actinomyceten zugeteilt worden (Hirsch, 1961). Weitere gram-positive Bakterien wurden in jüngster Zeit in die systematische Gruppe der coryneformen Bakterien eingeordnet (Baumgarten et al., 1974).

Die sechs neuisolierten Stämme von Wasserstoffbakterien, die als Indikatorstämme für die neuen Bakteriophagen benutzt worden waren, verhielten sich gram-negativ und besaßen im begeißelten Stadium eine polare Geißel, die höchstens zwei- bis dreimal so lang wie die Zellen selbst war. Eine Tendenz zu subpolarer Begeißelung konnte häufig beobachtet werden. Auf-

grund dieser Kriterien können die Neuisolate als Wasserstoff-oxidierende Pseudomonas-Arten angesehen werden, zu denen nach Davis et al. P.facilis, P.ruhlandii, P.flava und P.palleronii zählen (Davis et al., 1970).Dementsprechend wurden weitere Versuche zur Beschreibung der neuen Wirtsbakterien in Anlehnung an die Arbeiten von Davis et al. durchgeführt (Davis et al., 1969, 1970).

Bei einem Test zur Prüfung der Substratverwertung verhielten sich die Neuisolate weitgehend wie die beiden Arten Alcaligenes paradoxus und Pseudomonas flava, konnten aber wegen der Verwertung zahlreicher Zucker von Stämmen der Art Pseudomonas palleronii klar abgegrenzt werden. Es erwies sich als sehr schwierig, aber nicht als unmöglich, vom Substratspektrum her eine Zuordnung der neuen Stämme zur Art Alcaligenes paradoxus Biotyp I oder zur Art Pseudomonas flava, inklusive Stamm 450, durchzuführen. Im Wachstum auf Saccharose, Saccharat, Maltose, Cellobiose, meso-Inositol, Malonat und Tryptophan sowie auf exogener Poly-ß-hydroxybuttersäure verhielten sich die Stämme wie Pseudomonas flava und umgekehrt wie die Gesamtheit oder die Mehrheit der Stämme der Art Alcaligenes paradoxus. Für eine Verwandtschaft mit Alcaligenes paradoxus, nicht jedoch für eine Zuordnung zu Pseudomonas flava, sondern höchstens zu dem Stamm 450, der nur in wenigen Eigenschaften von dem sonst gleichen Pseudomonas flava abweicht, sprach lediglich die Verwertung von Leucin und Xylose durch die neuisolierten Stämme.

Ferner hatten die Neuisolate eine grünlich-gelbe Färbung, die im wesentlichen durch ein Pigment mit Absorptionsmaxima bei (400), 420 und 446 nm (in Petroleumbenzin) hervorgerufen wurde. Die Pigmentspektren der neuen Stämme wiesen große Ähnlichkeiten mit solchen Spektren auf, die für Pseudomonas palleronii bekannt sind (Davis et al., 1969, 1970; Reh, pers. Mitteilung). Dagegen wurden für die Carotinoidpigmente von Alcaligenes paradoxus Absorptionsmaxima bei ca. 405 und 425 nm

angegeben und für die von Pseudomonas flava Absorptionsmaxima bei (415), ca. 440 und 465 nm (Davis et al., 1969, 1970). Eine Zuordnung pigmentierter Bakterien zu bestimmten Spezies aufgrund des Carotinoidmusters gilt jedoch als sehr problematisch (Schmidt, pers. Mitteilung), wie auch die Ergebnisse der Pigmentuntersuchungen an den Neuisolaten mit den übrigen Untersuchungen kaum für eine taxonomische Bestimmung in Einklang zu bringen waren.

Die Analyse der Cytochrome heterotropher und autotropher Zellen hatte ergeben, daß die neuen Stämme Cytochrome vom a-, b- und c-Typ in unterschiedlichen Mengenanteilen besaßen. Ein Cytochrom a_2 mit einem α-Peak im Bereich von 620 bis 630 nm konnte allerdings erst in Pyridin-NaOH-Differenzspektren von autotrophen Zellen der Stämme GA und GD, die aus der stationären Phase abgeerntet wurden, festgestellt werden. Als einzigartig unter den gram-negativen Wasserstoffbakterien und als typisch für Alcaligenes paradoxus stellten Davis et al. den Besitz eines Cytochroms a_2 mit einem Absorptionsmaximum bei 625 nm dar (Davis et al., 1969, 1970). Sie erklärten aber nicht, mit Zellen welchen physiologischen Zustandes die Cytochromspektren erstellt wurden, obwohl nicht auszuschließen ist, daß das Cytochrommuster je nach Art der Anzucht und der Wachstumsphase geringfügigen Änderungen unterworfen ist. Weil unter diesen Umständen ein direkter Vergleich nicht möglich war, konnten die Cytochromuntersuchungen nur bedingt für die taxonomische Bestimmung der neuisolierten Wirtsbakterien ausgewertet werden.

Die neuen Wasserstoffbakterien sollen deshalb vorläufig der Art Pseudomonas flava zugeordnet werden, weil sie 1. gram-negativ sind, 2. monopolar begeißelt sind, 3. gelb pigmentiert sind und 4. in der Substratverwertung mit Pseudomonas flava und noch mehr mit dem nahe verwandten Stamm 450 die größten Gemeinsamkeiten aufweisen (siehe Tabelle 7, Seite 84/85). Eine Einordnung in die Art Alcaligenes paradoxus wurde trotz

vieler Ähnlichkeiten im Substratspektrum insbesondere wegen der abweichenden Begeißelung nicht vorgenommen. Die für Alcaligenes paradoxus charakteristischen langen, fragilen Geißeln, die zudem noch vorwiegend subpolar oder lateral inseriert sind (Davis et al., 1969, 1970), konnten bei keinem der neuen Bakterienstämme festgestellt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch Induktionsversuche mit Mitomycin-C wurde in Alcaligenes eutrophus eine extreme Verbreitung defekter Lysogenie festgestellt. Die elektronenmikroskopischen Analysen ergaben, daß zwei Drittel aller induzierten Stämme von Alcaligenes phagenschwanzähnliche Partikeln synthetisierten, die sich als Polysheaths innerhalb der Zelle oder als Inco-Partikeln in der Kulturflüssigkeit nachweisen ließen. Diese Partikeln wurden in die verschiedenen Gruppen der defekten Bakteriophagen eingeordnet. Ferner wurde versucht, diese Partikeln von den Bacteriocinen und bestimmten Colicin-Faktoren abzugrenzen.

2. Nach der Methode der Simultanisolierung wurden sieben neue Bakteriophagen (ga, gb, gc, gd1, gd2, ge und gf) und etwa 80 neue Wasserstoffbakterien isoliert, von denen sich sechs als geeignete Wirtsbakterien (GA, GB, GC, GD, GE und GF) für die neuisolierten Phagen erwiesen.

Die Phagen besaßen eine ausreichende Stabilität, und es konnten Lysate mit einem Titer von 1×10^9 bis 1×10^{10} Partikeln pro ml hergestellt werden. Die Plaques der Phagen waren auf Mineralplatten nach autotropher Inkubation 2 bis 7 mm und auf heterotrophen Zucker-Mineralplatten 0.5 bis 2.0 mm groß. Die temperente Natur der Phagen ga, gc, gd1, gd2, ge und gf konnte an mehreren Kriterien der Lysogenie nachgewiesen werden. Ferner wurden Bakterienstämme isoliert, die für die betreffenden Phagen lysogen waren. Die spezifische Dichte der Phagen ga, gd1, gd2, ge und gf wurde mit ϱ = 1.474 bis 1.476, die des Phagen gb mit ϱ = 1.486 bestimmt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß die Phagen ga und gb von ihrer Struktur her dem E.coli-Phagen T4 ähneln. Die übrigen Phagen (gc, gd1, gd2, ge und gf) sind wegen ihres langen, nicht kontrahierbaren Schwanzes dem E.coli-Phagen Lambda ähnlich.

Sie besitzen einen Appendix, der den Phagen gd1 und gf nachweislich als Adsorptionsorganell dient, mit dem sie spezifisch an die Fimbrien der Wirtsbakterien adsorbieren können.

3. Die sechs neuisolierten Indikatorstämme sind gelbpigmentierte Wasserstoffbakterien, die im 10 l-Braun-Biostat-Fermenter unter autotrophen Bedingungen so schnell wie die favorisierten Stämme von Alcaligenes eutrophus wachsen. Die neuisolierten Stämme sind untereinander auffallend ähnlich und lassen sich als monopolar begeißelte, gramnegative Stäbchen aufgrund ihrer Befähigung, auf zahlreichen Zuckern zu wachsen, entsprechend den Vorschlägen von Davis et al. (1969, 1970) zur Neuordnung der gram-negativen Wasserstoffbakterien vorläufig der Art Pseudomonas flava zuordnen.

ANHANG

Um spätere vergleichende ökologische Untersuchungen über die natürlichen Standorte von Wasserstoffbakterien zu erleichtern, soll die Herkunft der im Rahmen dieser Arbeit neuisolierten Knallgasbakterien angegeben werden. Die Proben wurden im Zeitraum von Juni bis Oktober 1973 gesammelt.

Tab. 9: Herkunft der Boden- und Flüssigkeitsproben

I	Ölverschmutztes Abwasser, quecksilberhaltig, aus Kompressionsanlagen der Wasserstoff-Abfüllstation der Messer-Griesheim-AG in Köln-Hürth
II	Wasser aus schattigem Teich mit aufgewirbelten Bodenanteilen, links gegenüber der Wassermühle nahe bei dem Schloß Denekamp, in Ost-Holland
III	Faulboden aus einem eingetrockneten Graben neben der Eichenallee im Schloßpark Denekamp in Ost-Holland
IV	Mischboden (Kulturland, Moorboden) neben dem Haus Brook 12, Amtsvenn Graes, Ahaus, NRW
V	Brackwasser aus einem tiefen schattigen Entwässerungsgraben ganz in der Nähe der vorhergenannten Stelle
VI - XI	Verschiedene, nicht selbst gesammelte Proben aus dem Raum Stommeln bei Köln (Waldboden, Gartenerde, feuchter Lehmboden und Bodenproben aus Baugruben)
XII - XIV	Vorwiegend eingetrocknete Bodenproben vom Gelände der Knappsack-AG, Köln-Hürth
XVII - XX	Flüssigkeitsproben aus dem Belebtschlamm der Kläranlage der Knappsack-AG, Köln-Hürth
XXI	Kinderschwimmbecken der Badeanstalt am Seeburger See
XXII	Faulerde neben dem Bootshäuschen am Seeburger See
XXIII	Schwarze Erde aus der hinteren Ummauerung der Weendequelle, Wasserschutzgebiet, Göttingen

XXIV	Derselbe Ort, Wasserprobe mit etwas Boden
XXV	Derselbe Ort, Quellwasser und helle Erde
XXVI	Faulboden aus der Weende, in der Nähe des vorher genannten Ortes, parallel zum Ententeich, in der Höhe der Steinbrücke
XXVII - XXX	Verschiedene, nicht selbst gesammelte Faulbodenproben aus eingetrockneten Gräben und Teichen des Schloßparks in Denekamp, Ost-Holland
XXXI	Algenhaltiges Wasser aus dem Ententeich in Weende an der Seite zum Weendebach
XXXII	Gemischte Probe (Wasser aus dem Ententeich Weende, von der Seite zum Dorf Weende hin und eine Faulbodenprobe aus Denekamp, Ost-Holland)
XXXIII - XXXV	Nicht selbst gesammelte Proben aus der Domäne Greene bei Einbeck (Probe 1 = Wasser aus Forellenteich vom Grund neben dem Überlauf, Probe 2 = Wasser aus einem Karpfenteich rechts neben dem Überlauf, in der Nähe des Baumes, Probe 3 = Wasser aus dem Karpfenteich, links neben dem Überlauf, etwa 5 m entfernt
XXXVI	Leinewasser aus dem Industriegebiet Göttingen, Stegemannstraße
XXXVII	Wasser aus dem Ententeich in der Nähe des vorher genannten Ortes
XXXVIII	Wasserprobe in der Nähe des vorher genannten Ortes
XXXIX - XLIII	Flußwasserproben, der Weende entnommen, direkt hinter der Quelle und über die Brücke hinaus, soweit der Fluß parallel zur Straße verläuft (Göttingen - Weende)
XLIV	Schwarzer Boden aus einem ehemaligen Komposthaufen oberhalb der Weende vor der Brücke (Göttingen - Weende)

Tab. 10: Liste der neuisolierten Knallgasbakterien

Nr. der Anreicherung	Benennung Auling	Benennung Baumgarten	vorgeschlagene neue Benennung
II	II1a		GZ 1
	II1b		GZ 2
	II2a		GZ 3
	II3a		GZ 4
	II4a		GA
	II4b		GZ 5
III	III3a		GZ 6
V	V1(64)		GZ 7
	V2		GZ 8
	V5		GZ 9
VI	V1		GZ 10
VIII	VIII1b		GZ 11
XI	XI		GZ 12
XVIII	18b2		GZ 13
XXII	22,1		GB
	22,2		GZ 14
	22,3c		GZ 15
	22,61		GZ 16
	22,7		GZ 17
XXIII	23,1		GZ 18
	23,2		GZ 19
	23,3		GZ 20
XXV	25,1		GZ 21
	25,1a		GZ 22
XXVI	26,1a		GZ 23
XXVIII	26,4		GZ 24
	28,2		GZ 25
XXIX	29,1		GZ 26
XXX	XXX1		GZ 27
	30,1	1	GZ 28
	30,1b	3	GZ 29

Nr. der Anreicherung	Benennung Auling	Benennung Baumgarten	vorgeschlagene neue Benennung
	30,1b klein	2	GZ 30
	30,3		GZ 31
	30,4		GZ 32
XXXII	32,1 weiß		GZ 33
	32,4		GZ 34
	32,5 gelb		GZ 35
XXXIII	33,1 gelb		GZ 36
	33,2a	4	GZ 37
	33,2b	5	GZ 38
	33,2c	6	GZ 39
XXXIV	34,2		GZ 40
	34,4a		GC
XXXV	35,1 rein		GZ 41
	35,1 Ist		GZ 42
XXXVI	36,1a		GZ 43
	36,1b gelb		GZ 44
	36,1c		GZ 45
	36,4 groß/gelb		GZ 46
XLII	42,1		GZ 47
	42,1a		GZ 48
	42,1b		GZ 49
	42,3a		GZ 50
	42,3b		GZ 51
	42,3c		GZ 52
	42,3d		GZ 53
	42,5		GZ 54
	42,5a		GZ 55
XLIII	43,1		GZ 56
	43,1b		GZ 57
	43,1c		GZ 58
	43,1d		GZ 59
	43,1e klein		GD
	43,2		GE

Nr. der Anreicherung	Bennenung Auling	Bennenung Baumgarten	vorgeschlagene neue Benennung
	43,5b1		GZ 60
	43,6		GZ 61
	43,9		GF
XLIV	44,1a		GZ 62
	44,1b		GZ 63
	44,1d		GZ 64
	44,1e		GZ 65
	44,1f		GZ 66
	44,2b	9	GZ 67
	44,3		GZ 68
	44,5bweiß		GZ 69

LITERATURVERZEICHNIS

Adams, M.H. 1959 Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York.

Adhikari, P.C. Chatterjee, S.N. 1972 Rhapidosomes in Vibrio species. Can.J. Microbiol. 18, 541-542.

Altenbern, R.A. Stull, H.B. 1965 Inducible lytic Systems in the Genus Bacillus. J. gen. Microbiol. 39, 53-62.

Amako, K. Yasunaka, K. Takeya, K. 1970 Relationship between Rhapidosome and Pyocin in Pseudomonas fluorescens. J. gen. Microbiol. 62, 107-112.

Aron, G.M. Pootjes, C.F. 1973a Replication of Bacteriophage SH-133 in the Facultative autotroph Hydrogenomonas facilis; I. Bacteriophage Synthesis under Heterotrophic, Autotrophic, and Mixotrophic Growth Conditions. J. Virol. 12, 1043-1048.

Aron, G.M. Pootjes, C.F. 1973b Replication of Bacteriophage SH-133 in the Facultative autotroph Hydrogenomonas facilis; II. Bacteriophage Synthesis and Hydrogenase Induction under Step-up and Step-down Growth Conditions. J. Virol. 12, 1118-1121.

Bartha, R. 1961 Physiologische Untersuchungen über den chemolithotrophen Stoffwechsel neu isolierter Hydrogenomonas-Stämme. Diss. Göttingen.

Baumgarten, J. Reh, M. Schlegel, H.G. 1974 Taxonomic Studies on Some Gram-positive Coryneform "Hydrogen Bacteria". Arch. Mikrobiol. 100, 207-217.

Bezdek, M.
Amati, P. 1967 Properties of P22 and a related Salmonella typhimurium Phage; I. General Features and Host Specifity.
Virol. 3, 272-278.

Bradley, D.E. 1967 Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins.
Bact. Rev. 31, 230-314.

Bradley, D.E. 1973a A pilus-dependent Pseudomonas aeruginosa bacteriophage with a long noncontractile tail.
Virol. 51, 489-492.

Bradley, D.E. 1973b Basic Characterization of a Pseudomonas aeruginosa Pilus-Dependent Bacteriophage with a long Noncontractile tail.
J. Virol. 12, 1139-1148.

Bradley, D.E.
Pitt, T.L. 1974 Pilus-dependence of Four Pseudomonas aeruginosa Bacteriophages with Non-contractile Tails.
J. gen. Virol. 24, 1-15.

Brandis, H.
Smarda, J. 1971 Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Brenner, S.
Horne, R.W. 1959 A negative staining method for the high resolution electron microscopy of viruses.
BBA 34, 103-110.

Brockmann, H.
Schodder, H. 1941 Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption.
Chem. Berichte 74, 73.

Cannon, R.E.
Shane, M.S.
Busch, V.N. 1971 Lysogeny of the blue-green alga Plectonema Boryanum.
Virol. 45, 149-153.

Caspar, D.L.D.
Klug, A. 1962 Physical Principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 1-24.

Clark-Walker, G.D. 1969 Association of microcyst formation in Spirillum itersonii with spontaneous induction of a defective bacteriophage. J. Bacteriol. 97, 885-892.

Clowes, R.C.
Hayes, W. 1968 Experiments in microbial genetics. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.

Coetzee, H.L.
de Klerk, H.C.
Coetzee, J.N. 1968 Bacteriophage - tail - like particles associated with intra - species killing of Proteus vulgaris. J. gen. Virol. 2, 29-36.

Cowan, S.T.
Steel, K.J. 1965 Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press.

Davis, D.H.
Doudoroff, M.
Stanier, R.Y.
Mandel, M. 1969 Proposal to reject the genus Hydrogenomonas: Taxonomic Implifications. Int. J. Syst. Bact. 19, 375-390.

Davis, D.H.
Stanier, R.Y.
Doudoroff, M.
Mandel, M. 1970 Taxonomis Studies on Some Gram-Negative Polarly Flagellated "Hydrogen Bacteria" and Related Species. Arch. Mikrobiol. 70, 1-13.

Delk, A.S.
Decker, C.A. 1972 Characterization of Rhapidosomes of Saprospira grandis. J. Mol. Biol. 64, 287-298.

Eberhardt, U. 1965 Über das wasserstoffaktivierende System von Hydrogenomonas H16. Diss. Göttingen.

Ellis, E.L.
Delbrück, M. 1939 The growth of bacteriophage.
J. gen. Physiol. 22, 365-384.

Endo, H.
Ayabe, K.
Amako, K.
Takeya, K. 1965 Inducible phages of E.coli 15.
Virol. 25, 469-471.

Falk, J.E. 1964 Porphyrins and Metalloporphyrins.
BBA Library, Vol. 2.

Finn, R.K. 1954 Agitation - aeration in the laboratory and in industry.
Bact. Rev. 18, 254-274.

Garro, A.J.
Marmur, J. 1970 Defective bacteriophages.
J. cell. Physiol. 76, 253.

Gumpert, J.
Taubeneck, U. 1968 "Mikrotubili" bei Proteus mirabilis als Produkte defekter Lysogenie.
Z. Allg. Mikrobiol. 8, 101-105.

Hirsch, P. 1961 Wasserstoffaktivierung und Chemoautotrophie bei Actinomyceten.
Arch. Mikrobiol. 39, 360-373.

Horne, R.W.
Wildy, P. 1961 Symmetry in virus architecture.
Virol. 15, 348-373.

Iida, H.
Inoue, K. 1968 Rhapidosomes of Clostridium botulinum type E.
Japan. J. Microbiol. 12, 353-355.

van Iterson, W.
Hoeniger, J.F.M.
Nigam van Zanten, E. 1967 A "microtubule" in a bacterium.
J. Cell. Biol. 32, 1-10.

Jensen, A.
Liaan Jensen, S. 1959 Quantitative Paper Chromatography of Carotenoids.
Acta Chem. Scand. 13, 1863-1868.

Jollick, J.D. 1972 Differential phage susceptibility of cell types in Caulobacter. J. gen. Virol. 16, 405-407.

Jüttner, R.R. 1973 Ausarbeitung eines Infrarot-spektrometrischen Verfahrens zur Bestimmung von Poly-ß-Hydroxybuttersäure und wachstumsphysiologische Untersuchungen. Diplomarbeit Göttingen.

Kageyama, M. Egami, F. 1962 On the purification and some properties of a pyocin, a bacteriocin produced by Pseudomonas aeruginosa. Life Sciences, 9, 471-476.

Kageyama, M. 1970a Genetic mapping of a bacteriocinogenic factor in Pseudomonas aeruginosa; I. Mapping of pyocin R2 factor by conjugation. J. gen. appl. Microbiol. 16, 523-530.

Kageyama, M. 1970b Genetic mapping of a bacteriocinogenic factor in Pseudomonas aeruginosa; II. Mapping of pyocin R2 factor by transduction with phage F116. J. gen. appl. Microbiol. 16, 531-535.

Kamen, M.D. Horio, T. 1970 Bacterial cytochromes. I. Structural aspects. Ann. Rev. Biochem. 39, 673-700.

Kaserer, H. 1906 Über die Oxydation des Wasserstoffes und des Methans durch Mikroorganismen. Zbl. Bakt. 2, 15, 573-576.

Kellenberger, E. Boy de la Tour, E. 1964 On the fine structure of normal and "polymerized" tail sheath of phage T4. J. Ultrastruct. Res. 11, 545-563.

Kharina, E.S.
Savel'eva, N.D.
Rautenshtein, Ya.I. 1968 A Bacteriophage for Bacteria of the Genus Hydrogenomonas.
Microbiol. (Moskau) 37, 381-386.

De Klerk, H.C.
Hugo, N. 1970 Phage - like Structures from Lactobacillus acidophilus.
J. gen. Virol. 8, 231-234.

Kluyver, A.J.
Manten, A. 1942 Some observations on the metabolism of bacteria, oxidizing molecular hydrogen.
Antonie v. Leeuwenhoek 8, 71-85.

Korant, B.D.
Pootjes, C.F. 1968 Bacteriophage production by autotrophically growing Hydrogenomonas facilis.
J. Virol. 2, 87-88.

Kraiss, J.P.
Gelbart, S.M.
Juhasz, S.E. 1973 A Comparison of three Mycobacteriophages.
J. gen. Virol. 20, 75-87.

Krizsanovich, K.
Appelbaum, P.C.
Coetzee, J.N. 1973 Ecology of Proteus Flagellar Phages.
Arch. Mikrobiol. 89, 241-245.

Kuhrt, M.
Pate, J.L. 1973 Isolation and characterization of tubules and plasma membranes from Cytophaga columnaris.
J. Bacteriol. 114, 1309-1318.

Levine, M. 1961 Effect of Mitomycin-C on Interactions between temperate Phages and Bacteria.
Virol. 13, 493-499.

Lewin, R.A. 1963 Rod - shaped particles in Saprospira.
Nature 198, 103-104.

Liaan-Jensen, S. 1962 The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems.
KGL. Norske Videnskab. Selskabs Skrifter No. 8.

Lotz, W.		Defective bacteriophages: The phage tail - like particles. Im Druck.
Lotz, W. Mayer, F.	1972	Isolation and Characterization of a Bacteriophage Tail - Like Bacteriocin from a Strain of Rhizobium. J. Virol. 9, 160-173.
Luria, S.E. Darnell, J.E.	1968	General Virology. John Wiley and Sons, Inc., New York.
Mauruschat, A.	1974	Cytologische Charakterisierung von Hydrogenomonas eutropha H16 und anderer Knallgasbakterien. Diplomarbeit Göttingen.
Meanningmann, H.D.	1965	Electronmicroscopy of the anti - bacterial agent produced by Escherichia coli 15. J. gen. Microbiol. 41, 151-154.
Meynell, E.W.	1961	A phage, φx, which attacks motile bacteria. J. gen. Microbiol. 25, 253-290.
Moody, M.F.	1967	Structure of the sheath of bacteriophage T_4. I. Structure of the contracted sheath and polysheath. J. Mol. Biol. 25, 167-200.
Nomura, M.	1967	Colicins and related Bacteriocins. Ann. Rev. Microbiol. 21, 257-284.
Orla-Jensen, S.	1909	Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems. Zbl. Bakt. II. Abt. 22, 305-346.
Otsuji, N. Sekiguchi, M. Iijima, T Takagi, Y.	1959	Induction of phage formation in the lysogenic E.coli K12 by Mitomycin-C. Nature, London, 184, 1079-1080.

Pate, J.L.
Johnson, J.L.
Ordahl, E.J.
1967 The fine structure of Chondrococcus columnaris. II. Structure and formation of rhapidosomes.
J. Cell. Biol. 35, 15-35.

Petracek, F.J.
Zechmeister, L.
1956 Determination of Partition Coefficients of Carotinoids as a Tool in Pigment Analysis.
Analyt. Chem. 28, 1484-1485.

Pfennig, N.
Lippert, K.D.
1966 Über das Vitamin-B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.
Arch. Mikrobiol. 55, 245-256.

Pootjes, C.F.
1964 Isolation of bacteriophage for Hydrogenomonas facilis.
J. Bact. 87, 1259-1260.

Pootjes, C.F.
Mayhew, R.B.
Korant, B.D.
1966 Isolation and Characterization of Hydrogenomonas facilis Bacteriophages Under Heterotrophic Growth Conditions.
J. Bact. 92, 1787-1791.

Prescott, L.M.
Altenbern, R.A.
1967 Detection of Bacteriophages from two strains of clostridium tetani.
J. Virol. 1, 1085-1086.

Rautenshtein, Ya.I.
Kharina, E.S.
Solov'eva, N.Ya.
Moskalenko, L.N.
Filatova, A.D.
1973 Bacteriophages of Hydrogen Bacteria and Lysogeny in these cultures.
Microbiology (Moskau) 42, 144-146.

Reeves, P.
1972 The bacteriocins.
In: "Molecular biology, biochemistry and biophysics" 11.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Reichenbach, H.
1967 Die wahre Natur der Myxobakterien - "Rhapidosomen".
Arch. Mikrobiol. 56, 371-383.

La-Riviere, J.W.M. 1958 On the microbial metabolism of the tartaric acid isomers. Diss. Delft.

Rösch, A. 1973 Transduktion bei Rhizobium lupini. Diss. Erlangen - Nürnberg.

Sakar, N.
Sarkar, S.
Kozloff, L.M. 1964 Tail components of T_2 bacteriophage. I. Properties of the isolated contractile tail sheath. Biochem. 3, 511.

Seaman, E.
Tarmy, E.
Marmur, J. 1964 Inducible Phages of Bacillus subtilis. Biochem. 3, 607-612.

Sekiguchi, M.
Takagi, Y. 1960 Effect of mitomycin C on the synthesis of bacterial and viral deoxyribonucleic acid. BBA 41, 434-443.

Schatz, A.
Bovell, C. 1952 Growth and Hydrogenase activity of a new bacterium Hydrogenomonas facilis. J. Bact. 63, 87-98.

Schlegel, H.G. 1966 Physiology and biochemistry of Knallgas-bacteria. Adv. Comp. Physiol. Biochem. 2, 185-236.

Schlegel, H.G.
Kaltwasser, H.
Gottschalk, G. 1961a Ein Submessverfahren zur Kultur wasserstoffoxidierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. 38, 209-222.

Schlegel, H.G.
Gottschalk, G.
Bartha, R. 1961b Formation and Utilization of Poly-ß-hydroxybutyricacid by Knallgas bacteria (Hydrogenomonas). Nature 191, 463-465.

Schlegel, H.G.
Lafferty, R.M. 1971 Novel energy and carbon sources. A. The production of biomass from hydrogen and carbon dioxide. Adv. biochem. engng. 1, 143-168.

Schmieger, H. 1968 Die molekulare Struktur transduzierender Partikeln beim Salmonella-Phagen P22. I. Dichtegradienten-Untersuchungen an intakten Phagen. Mol. gen. Genet. 102, 336-347.

Schmidt, K.
Liaan-Jensen, S.
Schlegel, H.G. 1963 Die Carotinoide der Thiorhodaceae. I. Okenon als Hauptcarotinoid von Chromatium okenii Perty. Arch. Mikrobiol. 46, 117-126.

Schuster, E. 1967 Chemolithotrophes Wachstum von Hydrogenomonas H16 im Chemostaten mit elektrolytischer Knallgaserzeugung. Diss. Göttingen.

Stent, G.S. 1963 Molecular Biology of Bacterial Viruses. Freeman and Comp., San Francisco.

Stickler, D.J.
Tucker, R.G.
Kay, D. 1965 Bacteriophage - like Particles. Released from Bacillus subtilis after Induction with Hydrogen Peroxide. Virol. 26, 142-145.

Stolp, H. 1957 Die Isolierung phagensensibler Bakterien aus einer lysogenen Kultur von Bac. megaterium. Arch. Mikrobiol. 26, 55-70.

Sutton, M.D.
Quadling, C. 1963 Lysogeny in a strain of Xanthomonas campestris. Can. J. Microbiol. 9, 821-828.

Takeya, K.
Minamishima, Y.
Ohnishi, Y.
Amako, K. 1969 Rod-shaped pyocin 28. J. gen. Virol. 4, 145-149.

Tikhonenko, A.S. 1970 Ultrastructure of Bacterial Viruses.
Plenum Press, New York, London.

Tohyama, K.
Sakurai, T.
Arai, H.
Oda, A. 1972 Studies on Temperate Phages of Lactobacillus salivarius.
I. Morphological, Biological and Serological Properties of Newly Isolated Temperate Phages of Lactobacillus Salivarius.
Jap. J. Microbiol. 16, 385-395.

Valentine, R.C.
Shapiro, M.M.
Stadtman, E.R. 1968 Regulation of Glutamine - Synthetase. XII. Electron Microscopy of the Enzyme of E.coli.
Biochem. 7, 2143-2152.

Watson, J.D. 1970 Molecular Biology of the Gene.
Benjamin, Inc., New York, 2. Aufl.

Weigle, J.
Meselson, M.
Paigen, K. 1959 Density Alteration Associated with Transducing Ability in the Bacteriophage Lambda.
J. Mol. Biol. 1, 379-386.

Wilde, E. 1961 Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydrogenomonas.
Diss. Göttingen.

Winkler, U.
Rüger, W.
Wackernagel, W. 1972 Bakterien-, Phagen- und Molekulargenetik.
Springer Verlag, Berlin.

Yamamoto, T. 1967 Presence of rhapidosomes in various species of bacteria and their morphological characteristics.
J. Bacteriol. 94, 1746-1756.

Yamamoto, T.
Chow, C.T. 1968 Mitomycin-D-Induction of a temperate phage in Pseudomonas aeruginosa.

Yamamoto, K.R.
Alberts, B.M.
Benzinger, R.
Lawhorne, L.
Treiber, G.

1970 Rapid Bacteriophage Sedimentation in the Presence of Polyethylene Glycol and its Application to Large-Scale Purification. Virol. 40, 734-744.

LEBENSLAUF

11.8.1945	Geboren als Sohn des Sparkassenangestellten Georg Auling und seiner Ehefrau Josefine, geb. Kock in Ahaus (NRW).
1953 - 1957	Besuch der Volksschule in Ahaus.
1957 - 1966	Besuch des humanistischen Alexander-Hegius-Gymnasiums in Ahaus.
Februar 1966	Ablegung der Reifeprüfung.
1.4.1966 - 30.9.1967	Ableistung der allgemeinen Wehrpflicht.
15.10.1967 - 19.11.1971	Studium der Biologie und Chemie an der Universität zu Köln.
21.1.1971	Ablegung der allgemeinen Prüfung in Philosophie und Pädagogik.
Febr. - Aug. 1971	Anfertigung der experimentellen Arbeit mit dem Thema "Zur Lokalisierung von Hexadecatriensäure in pflanzlichen Galaktolipiden" am Botanischen Institut der Universität Köln.
19.11.1971	Ablegung der Ersten Philologischen Staatsprüfung in Biologie.
1.1.1972	Wechsel zum Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen und Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH.
März 1973	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation.

Ich versichere, daß ich die Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Göttingen, im Januar 1975